

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**Descubrimiento racional de compuestos
químicos para el tratamiento de la leishmaniosis
y la enfermedad de Chagas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sergio Sifontes Rodríguez

DIRECTORES

José Antonio Escario García-Trevijano
Alfredo Irenaldo Meneses Marcel
Miguel Ángel Cabrera Pérez

Madrid, 2017

“Descubrimiento Racional de Compuestos Químicos para el Tratamiento de la Leishmaniosis y la Enfermedad de Chagas”

Autor: Sergio Sifontes Rodríguez, MSc¹

José Antonio Escario García-Trevijano, PhD²

Directores: Alfredo Irenaldo Meneses Marcel, PhD¹

Miguel Ángel Cabrera Pérez, PhD¹

Juan Francisco Infante Bourzac, PhD³

Asesores:

Oliver Germán Pérez Martín, PhD⁴

Gustavo Victoriano Sierra González, PhD⁵

1. Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba
2. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España
3. Departamento de Modelos Animales y Preclínica, Instituto Finlay, Cuba
4. Departamento de Inmunología, Instituto Superior de Ciencias Médicas “Victoria de Girón”, Cuba
5. Vicepresidencia de Investigación-Desarrollo, BioCubaFarma, Cuba

*“Que la pasión por la experimentación no me haga olvidar los
pacientes;
y que me alcance la vida, para que algún microbio dañino se acuerde
de mí con pesar.”*

Dedicatoria

A mi madre, modelo de sacrificio y amor;

A la memoria de mi padre;

*A mi diverso F_1 : Merlyn Laura, Daniela y Pedro Daniel; distintos,
especiales, importantes;*

A mi esposa Yade; justeza, bondad y amor.

Agradecimientos

- ✓ En primer lugar, a mi amigo, hermano probado y, desde un principio director de esta tesis, el Dr. Alfredo Meneses Marcel (el Menes), por su apoyo incondicional a lo largo de muchos años, su perseverancia en las gestiones internacionales y su desmedido empeño porque me hiciera Doctor en la Universidad Complutense de Madrid. ¡Gracias Menes!
- ✓ Al Dr. Miguel Angel Cabrera Pérez, por sus oportunas recomendaciones técnicas, por transmitirme parte de su saber en el campo del diseño racional de fármacos, por mostrarme caminos y perspectivas en la experimentación y por cargar con la burocracia asociada a un doctorado en Cuba.
- ✓ Al Dr. José Antonio Escario García-Trevijano, por acogerme en su colectivo y hacer que este doctorado llegara a un final feliz; por sus recomendaciones; por su apoyo durante mis estancias en la Universidad Complutense de Madrid y por las valiosas sesiones de trabajo en Cuba. Gracias.
- ✓ Al Dr. Juan Francisco Infante Bourzac (Juan Pancho), por su asesoría en los ensayos *in vivo*, por ser mi mentor de siempre, mi formador como investigador, modelo de disciplina, tenacidad y dedicación. Por ser además, como dice él, mi hermano mayor.
- ✓ Al Dr. Gustavo Sierra González, por la gestión de los compuestos probados en esta investigación, por su entusiasmo ante cada idea, por su apoyo en todos los ámbitos. Aprovecho además para agradecer a su esposa, María, más que todo, por su cariño.
- ✓ Al Dr. Oliver Pérez Martín, por sus críticas y recomendaciones; por su empeño en convertir ideas en proyectos, Ciencia en productos y estos, en beneficio para los pacientes; por su valentía y constancia.
- ✓ A Pompa, por sus sabias recomendaciones.
- ✓ A la Lic. Mirleida Santos Marcelo por ocuparse brillantemente de mi expediente de aspirante y todas las gestiones con la dirección de post-grado de la UCLV; pero

sobre todo, por tener el tacto para darle importancia a las cosas importantes en el momento apropiado.

- ✓ Al Lic. Evys Ancedes Gallardo por su ayuda en los estudios de estructura-actividad de los derivados 2-nitrovinilfuránicos y su asesoramiento en asuntos informáticos.
- ✓ A Caridad García Moya (Cary), muchas gracias por sacarme de tantos aprietos; te quiero.
- ✓ A la Lic. Yeny Morales Moreno; por su ayuda en la formulación y evaluación *in vitro* e *in vivo* de cocleatos inmunoactivos, que si bien ese aparte no se incluye en el cuerpo del presente documento, sí permitió abrir nuevas líneas de investigación.
- ✓ Al Dr. Ernesto Gulin, por su ayuda en la evaluación de la actividad de los compuestos frente a *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ Al colectivo del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, por introducirme al doloroso y fascinante mundo de las enfermedades parasitarias tropicales. Especialmente entre ellos a Nidia Garrido, por enseñarme el manejo de los protozoos en condiciones de esterilidad; a la Dra. Ana Margarita Montalvo, por su dulzura y por poner el laboratorio y su colección de cepas a mi disposición.
- ✓ A la Dra. Lianet Monzote Fidalgo, por ser mi mejor alumna, mi gran colega, ejemplo de dedicación; por su amistad. ¡Felicidades por tu segundo bebé!
- ✓ A la Dra. Yamilé López Hernández, por su ayuda en la estandarización de los ensayos *in vitro* y los estudios toxicológicos; por el tiempo dedicado durante estas investigaciones; por su contribución a mi F₁.
- ✓ Al Dr. Nilo Castañeda Cancio, primer director del Centro de Bioactivos Químicos y promotor del estudio de los derivados 2-nitrovinilfuránicos frente a la leishmaniosis (canina, en un primer momento). Gracias por su visión científica, su apoyo y consideración.
- ✓ A la Dra. Zenaida Rodríguez Negrín, actual directora del Centro de Bioactivos Químicos, por el cariño después del azote, por su persistencia en llevar este proyecto adelante, por su apoyo de muy diversas formas, por confiar en mí.

- ✓ Al Consejo Científico del Centro de Bioactivos Químicos, por tener la paciencia de oírme una y otra vez; por sus valiosas recomendaciones. Especiales agradecimientos en este contexto a los doctores Aliuska Morales Helguera, Guillermin Agüero Chapín y Gisselle Pérez Machado por la certeza y buena intención de sus críticas.
- ✓ A la Dra. Niurka Mollineda Diogo, compañera de pre-universitario, de universidad y del laboratorio; por soportarme durante tantos años y, además, hacerme creer que con gusto; por ocuparse de tantas cosas que ella sabe que me agobian; por ser de tanta ayuda, dejando incluso sus tareas a un lado; por su valiosa crítica experimental y literaria; por ser mi amiga.
- ✓ Al colectivo del Departamento de Parasitología de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres, en especial al Profesor Simon L. Croft y a la Dra. Vanessa Yardley, por instruirme en las técnicas para el estudio de la citotoxicidad y la actividad *in vitro* de compuestos frente a *Plasmodium falciparum*, *Leishmania spp*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*. Además, por introducirme gentilmente a la cultura inglesa.
- ✓ A la Lic. Leslie Martínez Mesa (Yeyi), por su ayuda en la preparación de las distintas presentaciones y en la redacción del documento final; por su cariño.
- ✓ A Maricel Meneses Gómez por poner a mi disposición el programa DASDE para la fusión de modelos y a Susana Meneses Gómez por sus correcciones lingüísticas en tiempo record.
- ✓ Agradezco especialmente la ayuda financiera recibida a través del proyecto de cooperación Cuba-Venezuela (VII Comisión Mixta) titulado “Desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis” (2007-2008); el proyecto institucional del Centro de Bioactivos Químicos “Desarrollo racional de fármacos para el tratamiento de la leishmaniosis” (2013-2017); y el proyecto auspiciado por el Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad (España) titulado “Aproximaciones basadas en la diana y fenotípicas para el descubrimiento de nuevos fármacos contra las tripanosomiasis africana y americana” (2016-2018).

- ✓ A mi esposa, Yadelín Portela Mesa (Yade), por lograr lo que ninguna de las anteriores logró, hacerme Doctor en Ciencias (PhD); por su apoyo, por permitirme dedicar a “los bichos” parte del tiempo que le correspondía, por “ponerme de castigo” frente a la computadora durante las vacaciones; pero sobre todo, por hacerlo con amor.
- ✓ A los que, de algún modo, han contribuido a la culminación exitosa de esta tesis a partir de la impresión del documento final y que no han podido ser expresamente reconocidos.
- ✓ A todos, mil gracias.

INDICE

A- RESUMEN	1
A1- Abstract	3
B- ABREVIATURAS	5
C- INTRODUCCIÓN	7
C.1. Hipótesis	10
C.2. Objetivo General.....	10
C.3. Objetivos Específicos	11
D- ANTECEDENTES	12
D1. La leishmaniosis	12
D1.2. Ciclo biológico.....	13
D1.3. Formas clínicas y epidemiología	15
D1.4. Control de la leishmaniosis.....	21
D1.5. Problemática del tratamiento de la leishmaniosis.....	26
D1.5.1. Fármacos en uso, indicaciones e inconvenientes	27
D2. Tripanosomiasis americana	33
D2.1. Taxonomía	35
D2.2. Ciclo biológico.....	35
D2.3. Vectores y reservorios.....	37
D2.4. Formas clínicas	38
D2.5. Epidemiología	41
D2.6. Control de la tripanosomiasis americana	42
D2.7. Problemática del tratamiento de la tripanosomiasis americana	43
D3. Enfoques para la búsqueda de medicamentos anti-leishmaniales y anti-chagásicos	46
D4. Descubrimiento de medicamentos asistido por computadoras	48
D4.1. Metodología para solucionar un problema de modelación QSAR	50
D4.1.1. Fuentes de datos	51
D4.1.2. Curado de la base de datos	52
D4.1.3. Formación de las series de datos	54
D4.1.4. Cálculo de descriptores	56
D4.1.5. Eliminación de compuestos extremos y precipicios de actividad	57
D4.1.6. Desarrollo de modelos	59
D4.1.7. Validación de los modelos.....	66
D4.1.8. Fusión de modelos	67
D4.1.9. Predicción	68
D4.1.9.1. Teorema de Bayes	69
D4.1.9.2. Dominio de aplicación.....	71
D5. Diseño racional de fármacos aplicado a <i>Leishmania</i> y <i>T. cruzi</i>	73
E- MATERIALES Y MÉTODOS	76
E1. Desarrollo de modelos de actividad para <i>L. major</i> y <i>T. cruzi</i>	76
E1.1. Modelos de actividad frente a <i>L. major</i>	76

E1.1.1. Base de datos, curado y formación de las series	76
E1.1.2. Cálculo de descriptores moleculares.	78
E1.1.3. Desarrollo de modelos.....	79
E1.1.4. Ensamble de modelos	79
E1.1.5. Robustez de los modelos.....	80
E1.1.6. Predicción de la actividad anti- <i>L. major</i>	80
E1.2. Desarrollo de modelos de actividad contra <i>T. cruzi</i>	81
E1.2.1. Base de datos, curado y formación de series.....	81
E1.2.2. Desarrollo, fusión y validación de modelos.....	83
E1.2.3. Predicción de la actividad anti- <i>T. cruzi</i>	84
E2. Evaluación biológica de compuestos teóricamente activos.....	85
E2.1. Actividad anti-leishmanial.....	85
E2.1.1. Parásitos y cultivos.....	85
E2.1.2. Curvas de crecimiento	85
E2.1.3. Compuestos a ensayar.....	86
E2.1.4. Actividad frente a promastigotes.....	87
E2.1.5. Citotoxicidad e índice de selectividad	88
E2.1.6. Relación estructura-actividad en los derivados nitrovinilfuránicos.....	88
E2.1.7. Actividad frente a amastigotes y citotoxicidad en macrófagos	89
E2.1.8. Actividad frente a la leishmaniosis cutánea experimental	90
E2.1.8.1. Animales.....	90
E2.1.8.2. Tratamiento experimental con Meclozina, Tioridazina y Furvina	91
E2.1.8.3. Estudio comparativo de Furvina y UC245.....	92
E2.1.8.4. Furvina y UC245 en administración cada 12h	93
E2.1.8.5. Furvina y UC245 vs. leishmaniosis cutánea avanzada	93
E2.1.8.6. Dosis-efecto de tioridazina y anfotericina B vs. leishmaniosis cutánea.....	93
E3. Actividad anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	93
E4. Actividad cruzada de compuestos anti-leishmaniales y anti- <i>T. cruzi</i>	94
F- RESULTADOS	95
F1. Estudios <i>in silico</i>	95
F1.1. Modelos matemáticos para actividad anti- <i>L. major</i>	95
F1.2. Modelos matemáticos para actividad anti- <i>T. cruzi</i>	101
F2. Evaluación de actividad anti-leishmanial.....	109
F2.1. Ensayos <i>in vitro</i> vs. <i>Leishmania</i>	109
F2.2. Ensayos <i>in vivo</i> vs. <i>Leishmania</i>	117
F3. Actividad <i>in vitro</i> frente a <i>T. cruzi</i>	128
F4. Actividad cruzada de compuestos anti-leishmaniales y anti-chagásicos.....	130
G- DISCUSIÓN	135
G1. Estudios <i>in silico</i>	135
G2. Ensayos biológicos.....	144
G2.1. Actividad anti-leishmanial.....	144
G2.2. Actividad frente a <i>T. cruzi</i>	161
G2.3. Actividad cruzada de compuestos selectos	161

H- CONCLUSIONES	168
I- RECOMENDACIONES	169
K- REFERENCIAS	170
L- ANEXOS	189

A-RESUMEN

La leishmaniosis y la enfermedad de Chagas son dos enfermedades olvidadas de alta prevalencia e impacto en la salud pública a escala mundial. Tienen en común que afectan primordialmente a los países más pobres, no existen vacunas eficaces y seguras para prevenirlas, los medicamentos disponibles son caros, tóxicos e ineficaces y cada día es más agravante el desarrollo de resistencia de los parásitos a los medicamentos en uso. En el presente trabajo se llevó a cabo una búsqueda de compuestos potencialmente activos frente a estos protozoos empleando herramientas quimio-informáticas acopladas a ensayos biológicos, y se orientó a fármacos licenciados con otras indicaciones.

Se modelaron dos bases de datos de cientos de miles de compuestos previamente probados frente a promastigotes de *Leishmania major* y de amastigotes intracelulares de *Trypanosoma cruzi*. Se calcularon los descriptores 0-2D implementados en el programa DRAGON y se obtuvieron modelos de clasificación (activos/inactivos) mediante los métodos estadísticos de análisis discriminante lineal y k-vecinos más cercanos. A partir de los modelos más diversos que cumplieron requisitos mínimos de ajuste se construyeron multclasificadores con adecuados indicadores de exactitud, robustez, poder predictivo y cobertura del dominio de aplicación. Con estos sistemas de modelos se clasificaron compuestos de actividad desconocida, utilizando como escenario de búsqueda los ingredientes farmacéuticamente activos de medicamentos en uso con otras indicaciones. Una selección de compuestos con la mayor potencialidad (según los modelos) y las mejores perspectivas (según la información farmacológica y toxicológica disponible) fueron evaluados frente a los parásitos *in vitro* e *in vivo*.

De los veinte compuestos selectos para ensayos *in vitro* frente a *Leishmania*, seis (30%) - clomifeno, meclozina, tioridazina, droperidol, furvina y toxoflavina - fueron activos frente a promastigotes de *L. amazonensis* y 2 (10%) – meclozina y tioridazina – además de ser activos contra los amastigotes intracelulares, tuvieron un índice de selectividad superior a 15. Tres de dichos compuestos (furvina, tioridazina y UC245) resultaron también activos en un modelo murino de leishmaniosis cutánea experimental.

De los cinco compuestos inicialmente seleccionados para ensayos de *actividad in vitro* frente a *T. cruzi*, uno (**20%**) – alprazolam – resultó activo contra los amastigotes intracelulares, aunque su especificidad fue baja. Mediante la evaluación de la actividad cruzada de los compuestos activos frente a uno u otro parásito se identificó un nuevo compuesto activo frente a promastigotes de *L. amazonensis* (ciproheptadina, $CI_{50}=5.8\pm0.2 \mu M$) y otro contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (MbA, $CI_{50}=5.7\pm1.1 \mu M$)

Además de los ingredientes farmacéuticamente activos, licenciados para otras indicaciones y con potencialidades de introducción en la clínica a corto (furvina) o mediano plazo (tioridazina), los estudios permitieron identificar otras familias de compuestos (derivados 2-nitrovinilfuránicos, anti-histamínicos y antidepresivos similares a la ciproheptadina y la tioridazina, y derivados trifeniletilénicos) con potencialidades a largo plazo.

Finalmente, los resultados demostraron la eficiencia de la combinación de los estudios quimio-informáticos y experimentales aplicados al reposicionamiento de fármacos, como estrategia para identificar compuestos potencialmente eficaces frente a enfermedades olvidadas y de alto impacto en la salud humana mundial.

A1-Abstract

Chagas' disease and Leishmaniasis are two neglected diseases of high prevalence and impact on public health worldwide. They primarily affect poor countries; there are no safe and efficacious vaccines to prevent them; the available drugs are expensive, toxic, ineffective and the emergence of drug-resistant parasite strains is of major concern. The aim of the present research work was searching for potentially active compounds against these two protozoa by using chemo-informatics techniques coupled with biological assays and focused on drugs already licensed for indications other than Leishmaniasis and Chagas' disease.

Two datasets resulting from the high throughput screening of two different libraries of hundreds of thousands compounds tested against *Leishmania major* promastigotes and *Trypanosoma cruzi* intracellular amastigotes were modeled. 0-2D descriptors implemented in DRAGON software were calculated and Linear Discriminant Analysis and k-Nearest Neighbors techniques were used to obtain classification models (active/inactive). The most diverse models satisfying minimum accuracy criteria were combined into multi-classifier systems with adequate accuracy, robustness, predictive power and applicability domain coverage. Such model systems were used to classify compounds of unknown activity in order to identify potentially active compounds among a dataset of pharmacologically active ingredients of already licensed drugs. A selection of compounds based on model predictions so as pharmacological and toxicological properties was tested against the parasites *in vitro* and *in vivo*.

Six compounds (clomiphen, meclozine, thioridazine, droperidol, furvine and toxiflavine) out of the 20 compounds (**30%**) selected for *in vitro* testing against *L. amazonensis* promastigotes were active. Two (10%) - meclozine and thioridazine – were also active against intracellular amastigotes and showed a selectivity index above 15. Moreover, three compounds (furvine, thioridazine and UC245) were active in an experimental model of murine cutaneous leishmaniasis.

Alprazolam was the only active compound against *T. cruzi* intracellular amastigotes out of the five (20%) initially tested; however, it showed low specificity. Other two active

compounds, one against *L. amazonensis* promastigotes (cyproheptadine, $IC_{50}=5.8\pm0.2$ μ M) and the other against *T. cruzi* intracellular amastigotes (MbA, $CI_{50}=5.7\pm1.1$ μ M) were found through the cross-activity analysis of compounds previously identified as active against any of the parasites.

Besides the pharmacologically active ingredients licensed for other indications with potential clinical use in the short (furfine) and mid terms (thioridazine), it was possible to identify other series of compounds (2-nitrovinilfuran derivatives, anti-histamine and anti-depressive drugs structurally similar to cyproheptadine and thioridazine, and triphenylethylene derivatives) with potential use as anti-trypanosomatids in the long term.

Finally, the results demonstrated the efficiency of the combination of chemo-informatics and experimental studies applied to drug repositioning as a strategy to identify potentially efficacious compounds for the treatment of neglected diseases of high impact on public health.

B. ABREVIATURAS

ADL: Análisis discriminante lineal

AmB: Anfotericina B

AMR: Refractividad molar

ALOGP: Coeficiente de partición octanol-agua de Ghose-Crippen-Viswanadhan

AUC: Área bajo la curva

C: Coeficiente de correlación de Matthews

CC₅₀: Concentración citotóxica media

CDM: Cuadrado de la distancia de Mahalanobis

CENPALAB: Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio

CE₅₀: Concentración eficaz media frente a amastigotes intracelulares

CI₅₀: Concentración inhibitoria media frente a promastigotes

CFPA: Compuestos formadores de precipicios de actividad

CPM: Concentración parasitocida mínima

DALY: Años de vida ajustados por discapacidad. Siglas en inglés de “*Disability adjusted life years*”

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMT: Dosis máxima tolerada

FAR: Tasa de falsa alarma o tasa de falsos positivos

fMet-tRNA: Ácido ribonucleico de transferencia - formilmetionina

FSH: Hormona estimulante del folículo. Siglas en inglés de “*Follicle stimulating hormone*”

HTS: Ensayo de alto rendimiento. Siglas en inglés de “*High-Throughput-Screening*”

IS: Índice de selectividad

kNN: k-vecinos más cercanos. Del Inglés K-nearest neighbors

LDA: Técnica de diluciones seriadas límites (de sus siglas en inglés *Limiting Dilution Assay*)

LGO: Método de dejar un grupo fuera. Del Inglés “Leave group out”

LH: Hormona luteinizante. Del Inglés “Luteinizing hormone”

MODI: Índice de modelabilidad. Del Inglés “*Modelability index*”

MSRE: Moduladores selectivos de los receptores de estrógenos

MW: Peso molecular. Del Inglés "*Molecular Weight*"

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAINS: Del Inglés "*PAn INterfering Substances*"

PCR: Reacción en cadena la de la polimerasa

pMax: Valor máximo de probabilidad según los distintos modelos de un multclasificador

pMax(+): Probabilidad máxima de pertenecer a la clase "activa"

pMax(-): Probabilidad máxima de pertenecer a la clase "inactiva"

pMedia: Media de las probabilidades según los distintos modelos de un multclasificador

pMedian: Mediana de las probabilidades según los distintos modelos de un multclasificador

Pr: Precisión

Q: Exactitud

QSAR: Relación estructura actividad. Del Inglés "*Quantitative Structure-Activity Relationship*"

Se: Sensibilidad

Sp: Especificidad

Tc: Coeficiente de similitud de Tanimoto

C-INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis y la enfermedad de Chagas constituyen, luego de la malaria, las enfermedades causadas por protozoos de mayor impacto en la salud pública a escala mundial; no solo por su alta incidencia, prevalencia y letalidad, sino también por su efecto deshabilitante.

En el mundo, cerca de 12 millones de personas padecen alguna forma de leishmaniosis y unos 8 millones sufren la enfermedad de Chagas. Mueren cada año entre 20 y 40 mil personas por leishmaniosis visceral^[1, 2] y 12 a 20 mil por el mal de Chagas en su estadio crónico.^[3-5] Los millones de años de vida ajustados (perdidos) por discapacidad (DALY) se estiman en 2.1 para la leishmaniosis y 0.67 para la enfermedad de Chagas.^[6] Sin embargo, más allá del sufrimiento causado por la enfermedad y la pérdida de vidas humanas, estos padecimientos son una carga económica para los sectores pobres, que representan la población más vulnerable.

Al costo del tratamiento y la atención médica se suma la incapacidad laboral de las personas enfermas; de modo que estas enfermedades engendran aun más pobreza. Menos recursos tiene la población afectada para el mejoramiento de las condiciones habitacionales mínimas, menos capacidad tienen de llevar a cabo medidas elementales para el control, más expuestos están a los vectores y con una mayor densidad de reservorios y hospederos infectados, más activa es la transmisión de los parásitos a las personas sanas. El ciclo de enfermedad-pobreza se retroalimenta viciosamente, haciendo la vida de los más pobres cada vez menos decorosa.

A este complejo escenario se suma que los fármacos disponibles para el tratamiento de estas enfermedades, en su mayoría, datan de varias décadas; por lo que el desarrollo de resistencia parasitaria ha provocado una disminución progresiva de la eficacia. La vasta diversidad de especies y cepas circulantes, con distinta susceptibilidad a los medicamentos, compromete adicionalmente el perfil de eficacia clínica de los fármacos en las distintas regiones.^[7]

Introducción

La toxicidad de los medicamentos disponibles, unido al alto costo y la necesidad de hospitalización (debido a los efectos adversos y requerimientos de administración sistémica) constituyen causas frecuentes de abandono del tratamiento, lo que contribuye al desarrollo de resistencia parasitaria. Los problemas de seguridad de los medicamentos en uso obligan a realizar un análisis de riesgo beneficio en cada caso, pues los efectos adversos pueden ser tan graves que en ocasiones comprometen la vida del paciente.

Un aparte especial requiere la forma cutánea de leishmaniosis que por no ser potencialmente letal se ubica al final de cualquier lista de prioridades, relegándola a la más olvidada entre las enfermedades olvidadas. Sin embargo, el efecto deshabilitante y el marcado estigma social que impone, sobre todo en mujeres, es brutal. Los pacientes se exponen a tratamientos sistémicos (con su toxicidad asociada) o a remedios de tan diversa y dudosa naturaleza que no son más que un reflejo del abandono social en el que quedan estos pacientes.

Ante la decadente eficacia de los medicamentos, el desarrollo de nuevos anti-leishmaniales y anti-chagásicos es una necesidad inmediata.^[7, 8] Sin embargo, para la industria farmacéutica, movida por las jugosas ganancias del mercado de medicamentos, las enfermedades que primordialmente afectan los países pobres no resultan de su interés. Se ha estimado que para llevar hasta el mercado una nueva entidad molecular se requiere como promedio unos 12-15 años y cerca de US\$ 802 millones.^[9] Posteriormente se ha calculado que el costo pudiera llegar incluso a los US\$ 2000 millones, en dependencia de la indicación y la firma que desarrolla el medicamento.^[10] Las posibilidades de recuperar tan alta inversión en el ámbito de una enfermedad del Tercer Mundo son remotas, de ahí el reconocido olvido en que están enfermedades como la leishmaniosis y la tripanosomiasis americana.

Solo por la contribución de innumerables organizaciones no gubernamentales, lideradas por la Organización Mundial de la Salud, con el apoyo financiero de múltiples agencias, empresas y gobiernos y con el papel determinante de científicos comprometidos con

esta causa en el mundo, se han logrado avances en la prevención, diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades.

Sobre la base de los limitados recursos disponibles y la población a que va destinado el medicamento final, todo proyecto orientado a la investigación de nuevos tratamientos para estas enfermedades debe considerar estrategias económicas de desarrollo y que el producto resultante sea del costo mínimo.

El **reposicionamiento de fármacos** resalta entre los enfoques para el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas para las enfermedades parasitarias olvidadas. Este consiste en explorar entre los medicamentos aprobados o en fases avanzadas de desarrollo para otras indicaciones, aprovechando el desarrollo previo y la información disponible de los productos. También es aplicable a fármacos que hayan demostrado seguridad en ensayos clínicos y que no resultaron eficaces para la indicación primaria para la cual fueron concebidos.^[11, 12]

Un compuesto reposicionado puede avanzar rápidamente desde los ensayos primarios de actividad hacia su nominación como candidato a fármaco y los ensayos clínicos. Se dispondrá de la información físico-química, la analítica, los estudios toxicológicos pre-clínicos, la seguridad clínica, los estudios farmacocinéticos, de estabilidad, de formulación e interacciones; los cuales representan un gasto sustancial en el proceso de desarrollo del fármaco. Consecuentemente, para la nueva indicación solo se requiere demostrar la actividad en el laboratorio, así como en modelos animales de la enfermedad, para entonces ejecutar los ensayos clínicos según las nuevas condiciones de uso.

El costo del fármaco reposicionado es aproximadamente el 60% de la inversión necesaria para su desarrollo como primera indicación, representando un ahorro de unos 320 millones de dólares.^[13] Sin embargo, esta no es solo una estrategia económica, sino que la probabilidad de fracaso en fases adelantadas del desarrollo del producto (que son las más caras) es también menor.

____ Introducción ____

El **descubrimiento de medicamentos asistido por computadoras**, basado en relaciones cuantitativas de estructura actividad (modelos QSAR), es una disciplina relativamente joven, pero con extensa aplicación debido a su alta eficiencia. La tasa de éxito en la evaluación masiva de grandes colecciones de compuestos por métodos robotizados ha sido de 0.06% (0.02 - 0.09%) para *L. donovani* y 0.55% (0.03 - 0.85%) frente *T. cruzi*.^[14] No obstante, recientemente se ha descrito una tasa del 11.3% (11/97) para *T. cruzi* al hacer una preselección mediante técnicas de aprendizaje automático.^[15]

Ante la problemática de la carencia de medicamentos apropiados para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas, unida a la falta de recursos para la investigación en este campo, se propuso para el presente trabajo combinar las bondades de la búsqueda de medicamentos asistida por computadoras y el reposicionamiento de fármacos para identificar compuestos con potencial actividad en el tratamiento de estas dos enfermedades. De ahí que el trabajo estuviera guiado por la siguiente hipótesis de investigación:

C.1. Hipótesis

La aplicación de estudios secuenciales *in silico*, *in vitro* e *in vivo* focalizados en medicamentos con otras indicaciones permitirá identificar ingredientes farmacéuticamente activos con potencial terapéutico para la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.

En base a esta hipótesis se formuló el siguiente objetivo general y los correspondientes objetivos específicos:

C.2. Objetivo General

- ✓ Descubrir compuestos activos frente a los agentes causales de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.

C.3. Objetivos Específicos

- ✓ Desarrollar modelos de predicción de la actividad contra *L. major* y *T. cruzi* basados en relaciones de estructura química - actividad antiparasitaria y emplearlos en la predicción de moléculas cuyo efecto biológico frente a estos parásitos es desconocido.
- ✓ Evaluar la actividad de productos selectos por métodos *in silico* en modelos para pruebas de eficacia contra *Leishmania spp* y *T. cruzi*.
- ✓ Evaluar la actividad cruzada de los productos con efecto antiparasitario frente a *T. cruzi* y *Leishmania spp*.

D. ANTECEDENTES

D1. La leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad crónica causada por protozoos parásitos del género *Leishmania* y transmitida de forma natural por insectos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Esta puede presentarse de diversas formas clínicas y con grados de severidad variables, desde casos asintomáticos hasta fatales. La sintomatología y curso de la enfermedad dependen primordialmente de la especie de *Leishmania* y del estado inmunológico del paciente.^[16]

D1.1. Taxonomía

El género *Leishmania* pertenece, al igual que los tripanosomas, a la familia *Trypanosomatidae*. Agrupa especies patógenas y no patógenas para el hombre. Se subdivide en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* dependiendo del segmento del intestino en que los promastigotes se multiplican en el insecto hospedero intermediario. Los del subgénero *Leishmania* se desarrollan en la parte media y los del *Viannia* en el intestino posterior. Cada subgénero se subdivide a su vez en complejos de especies que incluyen una o más especies de *Leishmania*. A continuación se muestra detalladamente la taxonomía de las distintas especies de *Leishmania*.^[17]

Reino: *Protista*

Phylum: *Protozoa*

Clase: *Zoomastigophorea*

Orden: *Kinetoplastida*

Familia: *Trypanosomatidae*

Género: *Leishmania*

Subgénero: *Leishmania*

- Complejo *L. donovani* (Especies: *L. chagasi**, *L. donovani* y *L. infantum*)
- Complejo *L. tropica* (Especies: *L. killicki** y *L. tropica*)
- Complejo *L. major* (Especie: *L. major*)
- Complejo *L. aethiopica* (Especie: *L. aethiopica*)

- Complejo *L. mexicana* (Especies: *L. amazonensis*, *L. garnhami**, *L. mexicana*, *L. pifanoi** y *L. venezuelensis*)
- Especies no patógenas para el humano
Viejo Mundo: *L. arabica* y *L. gerbilli*
Nuevo Mundo: *L. aristidesi*, *L. enriettii*, *L. deanei* y *L. hertigi*

Subgénero: *Viannia*

- Complejo *L. braziliensis* (Especies: *L. braziliensis* y *L. peruviana*)
- Complejo *L. guyanensis* (Especies: *L. guyanensis* y *L. panamensis*)
- No asignada a ningún complejo: *L. lainsoni*

*El estatus de especie está en discusión. *L. chagasi* en el Nuevo Mundo actualmente se considera la misma especie que *L. infantum*.^[18]

D1.2. Ciclo biológico

La leishmaniosis es transmitida mayoritariamente por insectos vectores. No obstante, se ha descrito con menos frecuencia la transmisión por vía sexual, transfusional, trasplante de órganos, vía transplacentaria, inoculación accidental en el laboratorio y por contacto directo lesión - lesión. Los insectos pueden transmitirla de una persona infectada a una sana (transmisión antroponótica) o de un animal enfermo al hombre (transmisión antrozoonótica).

La leishmaniosis es transmitida por la picadura de un insecto flebótomo hembra infectado (**Figura 1**). El vector inyecta el estadio infectante (promastigote) desde su proboscis durante la ingestión de sangre ❶. Los promastigotes introducidos en la piel son fagocitados por los macrófagos ❷ y otros tipos de células fagocíticas mononucleares. Dentro de estas células, los promastigotes se transforman en amastigotes ❸, los cuales se multiplican por fisión binaria y luego infectan otras células fagocíticas mononucleares ❹. Factores dependientes del parásito y del hospedero determinan si la infección se hace sintomática y si se presenta una leishmaniosis cutánea o visceral. Los flebótomos se contagian cuando ingieren células infectadas al alimentarse de sangre ❺ ❻. En el intestino de los insectos flebótomos los amastigotes

Antecedentes

se transforman en promastigotes, se dividen⁷ (en el intestino posterior los del subgénero *Viannia* y en el intestino medio los del subgénero *Leishmania*) y finalmente migran hacia la proboscis⁸. Desde aquí, los promastigotes podrán acceder a los hospederos vertebrados cuando nuevamente el insecto se alimente de sangre.

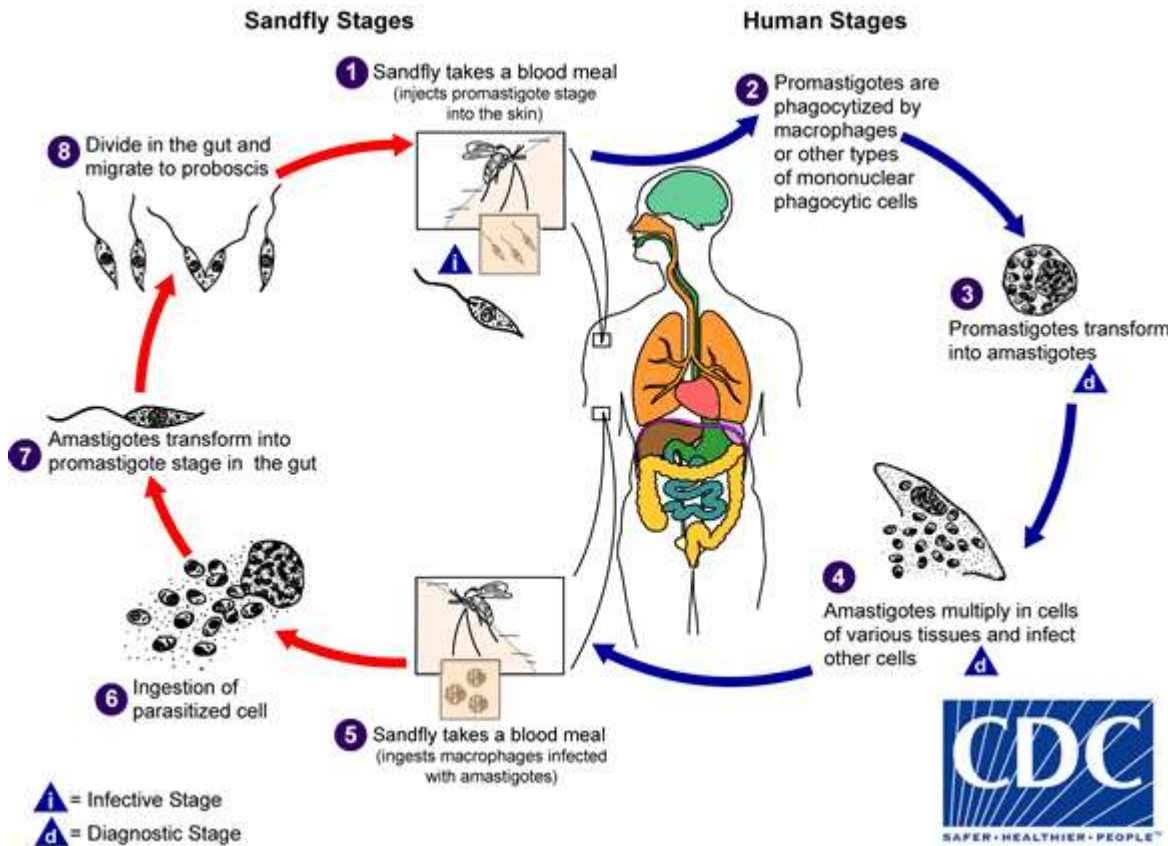


Figura 1: Ciclo biológico de la leishmaniosis humana.^[19]

Existe gran diversidad de hospederos y reservorios para las distintas especies de *Leishmania*; siendo precisamente estos quienes determinan la distribución geográfica de las distintas formas clínicas de leishmaniosis. Entre los hospederos reservorios se han descrito varias especies de mamíferos que incluyen jerbos, damanes, murciélagos, puercoespines, zarigüeyas, perezosos, perros, gatos, zorros, osos hormigueros y primates, entre otros.^[20]

Las especies de vectores que transmiten *Leishmania* spp en el Viejo Mundo pertenecen al género *Phlebotomus*. En cambio, en el Nuevo Mundo la transmisión es mediada por especies del género *Lutzomyia*, de las cuales *Lu. longipalpis* juega un rol primordial, ya que, a diferencia de la mayoría de los flebótomos, esta es capaz de transmitir varias especies de *Leishmania*, incluyendo *L. infantum*.^[21]

D1.3. Formas clínicas y epidemiología

La leishmaniosis se presenta de cinco formas clínicas fundamentales y es prevalente en 98 países pertenecientes a cinco continentes (América del Norte, América del Sur, Europa, África y Asia). Cada año ocurren cerca de 1.3 millones de casos nuevos; de los cuales 300 000 son de la forma visceral y el resto de la cutánea y mucocutánea, fundamentalmente.^[2]

La leishmaniosis cutánea (**Imagen 1**) es la forma más frecuente. Se presenta como úlceras únicas o múltiples que se desarrollan en el punto de la picadura del insecto y pueden tardar desde meses hasta varios años en sanar. Con frecuencia se infectan de forma secundaria con hongos y bacterias que complican el cuadro clínico y retardan la recuperación. Lo más habitual es que las lesiones se presenten en las zonas expuestas del cuerpo y cuando se ubican cerca de las articulaciones, los ojos, la boca o vasos sanguíneos importantes pueden tener una mayor significación clínica.



Imagen 1: Fotos de pacientes con leishmaniosis cutánea (tomadas de diversas fuentes)

La forma cutánea se encuentra ampliamente distribuida. Sin embargo, 70-75% de los casos se concentra en los diez países con más alta incidencia, a saber: Afganistán,

____ Antecedentes ____

Argelia, Brasil, Colombia, la República Islámica de Irán, Pakistán, Perú, Arabia Saudita, la República Árabe Siria y Tunes (**Figura 2**).

El control de las epidemias de leishmaniosis cutánea en Afganistán y la República Árabe Siria ha estado obstaculizado por la prevalencia de la guerra y los disturbios sociales.^[22] Se han presentado brotes en otros países endémicos como Argelia y Marruecos, pero han sido controlados y el número de casos se ha reducido significativamente. Argelia declaró más de 30 000 casos en el 2005 mientras que solo 6428 en el 2013. En tanto, Marruecos informó 6700 casos de leishmaniosis cutánea zoonótica en el 2010 y 537 en el 2013.^[23]

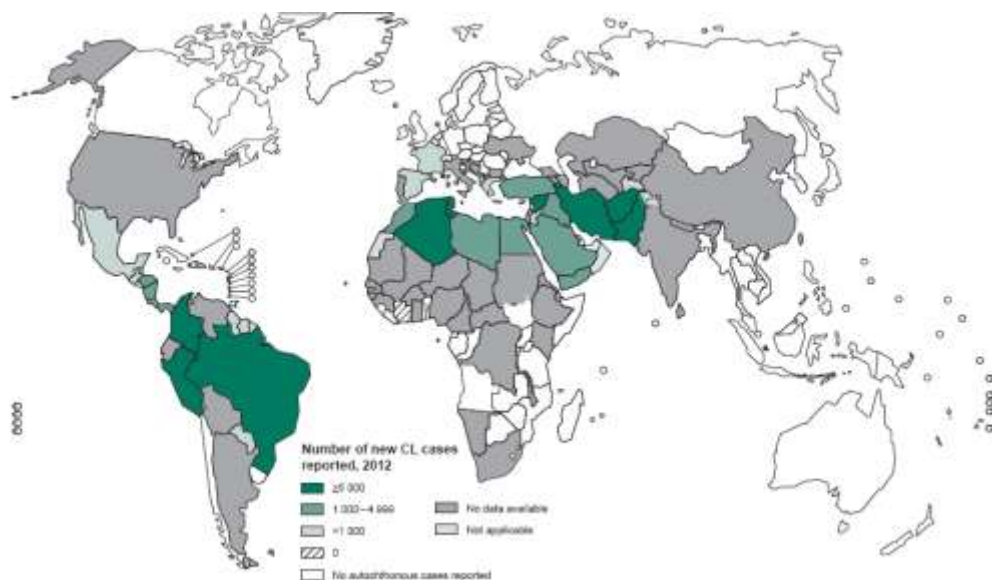


Figura 1: Distribución mundial de la leishmaniosis cutánea^[23]

La leishmaniosis visceral (**Imagen 2**) es la forma más grave de la enfermedad. Esta es causada por el complejo *L. donovani* en África Oriental y el subcontinente Indio, mientras que *L. infantum* es el agente causal en Europa, el norte de África y Latinoamérica.^[24] En este caso los parásitos se alojan y multiplican en el hígado, el bazo y la médula ósea roja. Se produce aumento del tamaño de estos órganos asociada a una incapacidad funcional que se refleja en pérdida de peso progresiva, anemia y finalmente sobreviene la muerte en la mayoría de los pacientes que no reciben tratamiento adecuado.



Imagen 2: Fotos de pacientes con leishmaniosis visceral (tomado de fuentes diversas)

La coexistencia de leishmaniosis y el SIDA es particularmente relevante en los países de la cuenca del Mediterráneo. El SIDA agrava los síntomas de la leishmaniosis visceral, dificulta el tratamiento y la frecuencia de recaídas es alta. Debido al rol determinante que desempeña el sistema inmune en el desarrollo de la leishmaniosis, en estos países donde la carga parasitaria en los reservorios es baja, la leishmaniosis llega a considerarse un criterio diagnóstico de infección por VIH.

El 90% de los casos de leishmaniosis visceral se concentra en Bangladesh, Brasil, Etiopía, La India, Nepal, Sudán del Sur y Sudán (**Figura 3**).

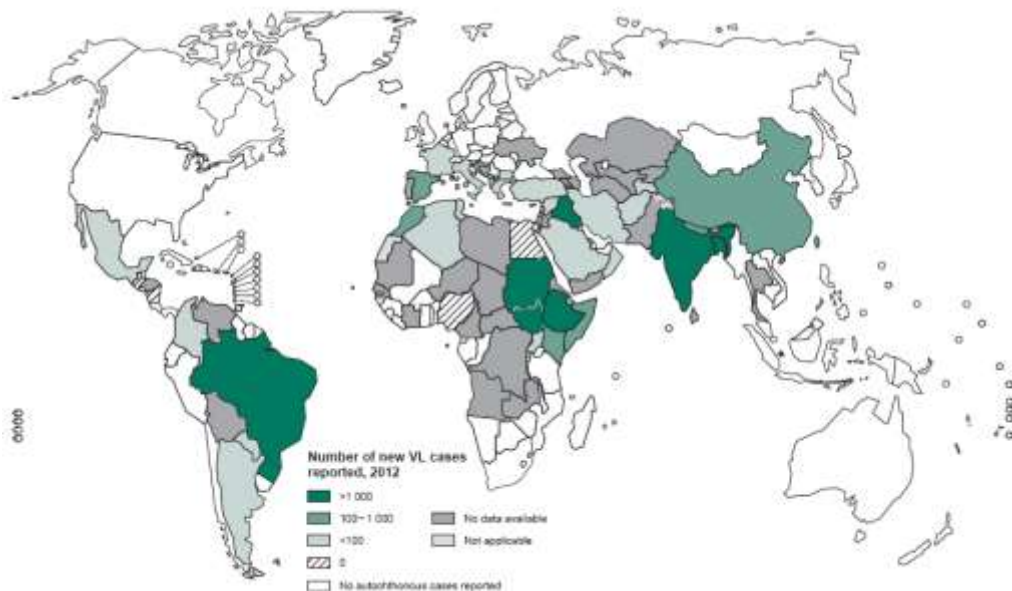


Figura 2: Distribución mundial de la leishmaniosis visceral^[23]

Antecedentes

El estimado de muertes a consecuencia de la leishmaniosis es bastante incierto y se basa fundamentalmente en los registros de pacientes fallecidos en los hospitales. Se estima que como consecuencia de la leishmaniosis visceral mueran anualmente de 20'000 a 40'000 personas.^[1, 2]

En el Este de África, particularmente en Sudán del Sur y Sudán, son frecuentes las epidemias de leishmaniosis visceral con altas tasas de mortalidad. En Sudán del Sur ocurrió una epidemia en los años noventa con una mortalidad del 37%. Nuevamente en el periodo 2009–2012 se presentaron más de 28'000 casos y 850 muertes. Se postula que gracias a la rápida intervención de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Medicinas Sin Fronteras y otras organizaciones no-gubernamentales en colaboración con el Gobierno sudanés, en esta última epidemia pudo mantenerse la mortalidad por debajo del 5%.^[25]

En Brasil en el 2006 la tasa de mortalidad fue del 7.2%. En cambio en el Subcontinente Indio, donde ocurre el foco responsable de la mayor cantidad de casos de leishmaniosis visceral en el mundo, la mortalidad osciló desde 1.5% en Bangladesh (93 muertes/6224 casos entre los años 2004-2008) y 2.4% en la India (853/34918) hasta un 6.2% en Nepal (91/1477).^[1] Sin embargo, estudios comunitarios en Sudán y la India que incluyeron la búsqueda activa de casos fatales debido a leishmaniosis visceral estimaron tasas de mortalidad superiores al 10%. Asimismo, un estudio a nivel de villas en la India sugirió que el 20% de los pacientes con leishmaniosis visceral murió antes de que fueran diagnosticados.^[26-28]

La distribución de la leishmaniosis se ha expandido durante las dos últimas décadas y el número de casos reportados ha aumentado sustancialmente. Sin embargo, la incidencia y prevalencia reales se desconocen debido a que la declaración de casos es obligatoria solo en el 34% de los países donde la leishmaniosis es endémica. Entre los factores de riesgo que facilitan su diseminación se incluyen la pobreza, la malnutrición, los cambios climáticos y ambientales, el aumento de la movilidad de las poblaciones, los conflictos bélicos, los estados de inmunosupresión tales como la co-infección con

VIH y, en algunas áreas, la rápida urbanización y el establecimiento de nuevos asentamientos.^[29, 30]

La co-infección de *Leishmania* y VIH incrementa la susceptibilidad a la leishmaniosis visceral y afecta la epidemiología de la enfermedad. En el año 2013, 35 países donde la enfermedad es endémica habían declarado casos de co-infección con VIH. En Brasil y Etiopía las tasas de co-infección de VIH y leishmaniosis visceral han mostrado una tendencia al aumento. En Brasil aumentó desde cerca del 2.5% (2005) a 6.6% (2011), y en el Norte de Etiopía desde 19% (1998–1999) a 34% (2006–2007). No obstante, la introducción y uso extensivo de los antirretrovirales ha ayudado a reducir la incidencia de leishmaniosis visceral, ha retardado las recaídas de estos pacientes e incrementado su sobrevivencia en muchos países.^[23]

La leishmaniosis mucocutánea (**Imagen 3**) se presenta con menor frecuencia que las dos anteriores. Existe de modo endémico solamente en Latinoamérica, concentrándose cerca del 90% de los casos en Bolivia, Brasil y Perú. Esta forma de la enfermedad aparece varios años después de haber padecido el paciente una leishmaniosis cutánea y se asocia a especies de *Leishmania* que solo circulan y se transmiten en América Latina. *L. braziliensis* (30% de los casos), *L. panamensis* (5%), *L. guyanensis* (rara vez) y *L. peruviana* (casos anecdóticos) han sido las especies mayormente implicadas en esta forma de la enfermedad.^[31]



Imagen 3: Fotos de pacientes con leishmaniosis mucocutánea (tomadas de diversas fuentes)

Los parásitos se asientan en los tejidos blandos de la región nasal, faríngea y laríngea provocando destrucción tisular y consecuentemente deformaciones monstruosas del

Antecedentes

rostro. Dicha forma es considerablemente refractaria al tratamiento y de alta letalidad. Las personas afectadas se aíslan debido al estigma social y muchas veces finalmente se internan en la selva para morir.^[23]

La leishmaniosis cutánea difusa (**Imagen 4**) está asociada a una anergia del sistema inmune del paciente. Se presenta como una miríada de lesiones en forma de pápulas, placas o nódulos diseminados por toda la superficie corporal. Su evolución es lenta, no cura espontáneamente y los enfermos tienden a la recaída después del tratamiento. Solo unas pocas especies de *Leishmania* causan esta forma clínica, de ahí su distribución focal.



Imagen 4: Fotos de pacientes con leishmaniosis cutánea difusa (tomadas de diversas fuentes)

La leishmaniosis dérmica post-kala-azar (**Imagen 5**) es una posible secuela de la leishmaniosis visceral en África y Asia. Se caracteriza por un *rash* cutáneo hipopigmentado de forma macular, maculopapular o nodular en pacientes que usualmente se han recuperado de una leishmaniosis visceral.



Imagen 5: Fotos de pacientes con leishmaniosis dérmica post-kala-azar (tomadas de diversas fuentes)

Usualmente aparece de seis meses a un año o más después de la cura aparente de la enfermedad. No obstante, puede ocurrir antes e incluso durante el curso de una leishmaniosis visceral, especialmente en Sudán. Cura normalmente de forma espontánea en los países africanos, pero rara vez hay casos de autocuración en la India.

Si bien la leishmaniosis cutánea difusa, la mucocutánea y la dérmica post-kala-azar son menos frecuentes, también han resultado más difíciles de tratar.^[31]

D1.4. Control de la leishmaniosis

Según el ciclo biológico de *Leishmania* spp, el control de la leishmaniosis pudiera dirigirse teóricamente a: 1) el parásito 2) los vectores, 3) los hospederos reservorios y 4) el enfermo (humano o animal). Sin embargo, este análisis se torna complicado por la compleja epidemiología de la enfermedad como resultado de la diversidad de especies patógenas de *Leishmania*, por la variedad de vectores y reservorios (con sus respectivas distribuciones geográficas y localizaciones) y la multiplicidad de formas clínicas.

La coexistencia e interacción de ciclos selváticos y peridomiciliarios de transmisión obstaculizan las estrategias destinadas al control vectorial y de los reservorios. No obstante, son potencialmente adecuadas para el control de algunas formas clínicas en ciertas localidades. Recientemente, un comité de expertos de la OMS ha recomendado estrategias pormenorizadas de control según las distintas entidades nosogeográficas.^[32]

La leishmaniosis visceral en el subcontinente indio es producida por *L. donovani* y transmitida fundamentalmente por *P. argentipes*, *P. orientalis* y *P. martini*. La transmisión es de la persona infectada al vector y de este a la persona sana, o sea, sin que medien otros reservorios mamíferos. En este caso, los pacientes de leishmaniosis visceral y de leishmaniosis dérmica post-kala-azar constituyen los reservorios y la transmisión es esencialmente peridomiciliaria.^[33] Dadas estas circunstancias, es factible

____ *Antecedentes* ____

reducir la prevalencia de la enfermedad mediante el control de los vectores, el diagnóstico temprano y el tratamiento eficaz de los enfermos.^[32]

La leishmaniosis visceral en Latinoamérica, Europa y el norte de África es causada por *L. infantum*. La transmisión es predominantemente peridomiliaria y el reservorio fundamental es el perro.^[33] Es por ello que, al menos en las áreas urbanas de estas regiones, es factible el control de la leishmaniosis visceral mediante el control en la población canina. En este sentido, las acciones han abarcado el sacrificio masivo de los perros asociado a la aplicación intradomiliaria de insecticidas,^[34] el sacrificio de los perros enfermos o seropositivos, y el tratamiento temprano o la vacunación para reducir la transmisión.^[35, 36]

Existe consenso en que el tratamiento de los perros enfermos, incluso con anfotericina B, no es un procedimiento eficiente para reducir la transmisión; por el contrario, tiene el inconveniente de propiciar el desarrollo de resistencia parasitaria.^[35, 37] Sin embargo, existen evidencias de que el uso de collares impregnados con deltametrina para reducir las picaduras por los vectores tiene un impacto significativo en la incidencia de la enfermedad, al menos durante las estaciones de alta transmisibilidad.^[38]

Existe una forma de leishmaniosis cutánea antroponótica producida por *L. tropica* que es transmitida peridomésticamente por *P. sergenti* en el Norte de África, el Medio Este, Irán y Afganistán,^[33] cuyo control pudiera seguir estrategias similares a las utilizadas para la leishmaniosis visceral en el subcontinente indio. No obstante, en zonas áridas de esta región coexiste la transmisión zoonótica de leishmaniosis cutánea por *L. major*, *L. arabica* y *L. killicki* en la que participan roedores de vida silvestre y que escaparía a dichas medidas de control.

Ante la mayoritaria ineficiencia del control de los vectores y reservorios, la mejor alternativa sería la **vacunación** de la población en riesgo. Sin embargo, a pesar de los múltiples intentos, aún no existe una vacuna eficaz para el tratamiento o prevención de la leishmaniosis. Las características genéticas del parásito y del hospedero, los variados escenarios epidemiológicos y, ante todo, las diversas respuestas inmunes desencadenadas por las distintas especies de *Leishmania* han sido reconocidos como

los factores fundamentales que han interferido.^[39] Actualmente se conoce que para lograr protección contra la infección por *Leishmania* es importante inducir una respuesta Th1 pro-inflamatoria. Pese a ello, existen muchas incógnitas sobre la inducción, regulación y persistencia de la respuesta inmune Th1 específica a *Leishmania*.^[39]

Las primeras prácticas clínicas para inducir respuesta inmune contra *Leishmania* consistieron en la inoculación de parásitos vivos y virulentos en individuos sanos. Este procedimiento se conoció como “Leishmanización” y aun cuando los índices de protección fueron altos (80%), fue suspendido debido al desarrollo de lesiones persistentes y a inmunosupresión.^[40] Las vacunas de primera generación a base de promastigotes enteros de *Leishmania* inactivados por calor remplazaron la Leishmanización y se evaluaron tanto contra la forma visceral como contra la cutánea.^[41, 42] También se han desarrollado vacunas de segunda y tercera generación basadas en subunidades sintéticas o recombinantes definidas y ADN, respectivamente. No obstante, a pesar de los muchos años de esfuerzo en la identificación de antígenos potenciales^[43] y de los avances en Vaccinología, aún no existe un candidato vacunal capaz de inducir el nivel de protección requerido para el control de la enfermedad.^[39]

En ausencia de una vacuna eficaz y segura, y ante el limitado alcance del control de los hospederos, reservorios y vectores, quedan como acciones primordiales el **diagnóstico temprano** y la optimización del **tratamiento**. Si bien estas últimas estrategias tienen menor impacto a escala poblacional en términos de transmisibilidad y persistencia de los focos, son esenciales para reducir la mortalidad, la letalidad y las afectaciones socio-económicas asociadas a la leishmaniosis.

El diagnóstico de la leishmaniosis se basa en los síntomas clínicos, exámenes parasitológicos, pruebas serológicas y técnicas diagnósticas para el reconocimiento de antígenos de *Leishmania*. Existen procedimientos diagnósticos generales y otros específicos en dependencia de las formas clínicas.

En el caso de la leishmaniosis visceral, la infección puede cursar asintóticamente o mostrar una sintomatología sistémica característica. El valor predictivo positivo del diagnóstico clínico es elevado en pacientes con síntomas típicos de la enfermedad. Sin

Antecedentes

embargo, a menudo los signos y síntomas clínicos no permiten un diagnóstico conclusivo y se confunden con otras enfermedades co-endémicas como la malaria crónica, la esquistosomiasis y otras enfermedades sistémicas. También se dificulta el diagnóstico en pacientes que padecen simultáneamente de leishmaniosis visceral y SIDA debido a que se producen presentaciones atípicas.^[44] Debe sospecharse de leishmaniosis visceral en un paciente con fiebre y esplenomegalia que vive o regresa de una zona endémica. La presencia de forma aislada o simultánea de anemia, leucopenia, trombocitopenia o hiperganmaglobulinemia refuerza la sospecha clínica, pero requiere la confirmación diagnóstica por pruebas de laboratorio específicas para *Leishmania* spp.^[32]

El espectro clínico de la leishmaniosis cutánea es amplio y puede semejar otras enfermedades de la piel, como las infecciones por estafilococos o estreptococos, las úlceras por micobacterias, la lepra, infecciones fúngicas, cáncer, sarcoidosis y la úlcera tropical. Por estas razones y por las molestias, costos y reacciones adversas relacionadas con el tratamiento se requieren pruebas confirmatorias para la confirmación del diagnóstico clínico presuntivo.^[32]

La visualización de los amastigotes mediante el examen microscópico de muestras de tejido es la prueba confirmatoria clásica para la leishmaniosis, debido a su alta especificidad. A pesar de ello, la sensibilidad del diagnóstico parasitológico de leishmaniosis visceral varía según la fuente de la muestra, siendo la más alta en aspirados de bazo (93-99%) y algo menor en los de médula ósea (53-86%) o ganglios linfáticos (53-65%). No obstante, en la toma de aspirados de bazo se producen hemorragias graves en 0.1% de los pacientes, por lo que se requiere personal capacitado e instalaciones médicas apropiadas para este proceder.

El diagnóstico serológico de leishmaniosis visceral se lleva a cabo actualmente mediante la prueba de aglutinación directa y la prueba inmunocromatográfica basada en el antígeno rK39. Estas fueron diseñadas para su uso en condiciones de campo y han mostrado buena exactitud diagnóstica en la mayoría de las áreas endémicas. No obstante, debido a la persistencia de anticuerpos específicos durante varios años

después de la curación no es posible identificar casos de recaídas. Asimismo, individuos asintomáticos sin antecedentes clínicos que viven en áreas endémicas pueden resultar serológicamente positivos. Por ende, los métodos serológicos deben siempre emplearse en combinación con el diagnóstico clínico.^[32, 44]

Los métodos serológicos son de poca utilidad en el diagnóstico de la leishmaniosis cutánea por su baja sensibilidad y especificidad variable. La prueba cutánea de leishmanina (Prueba de Montenegro) puede ser de utilidad en estudios epidemiológicos, pero es de escaso valor diagnóstico. Ni las pruebas serológicas ni la prueba cutánea pueden distinguir entre una infección pasada y una actual.

Las pruebas basadas en la detección de antígenos son más específicas que las pruebas serológicas porque evitan las reacciones cruzadas, además de distinguir entre infecciones recientes y pasadas. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa ha resultado superior a la PCR convencional en la diferenciación de infecciones asintomáticas y activas, al igual que para la identificación de co-infección de VIH y leishmaniosis visceral. Recientemente, se ha evaluado la presencia de un antígeno polisacárido en la orina de pacientes de leishmaniosis visceral mediante una prueba de aglutinación en látex en el Este de África y en el Subcontinente Indio. La especificidad de la prueba ha resultado elevada, pero los valores de sensibilidad han sido de bajos a moderados.

Los pacientes co-infectados con *Leishmania* y VIH suelen tener cargas parasitarias más altas y los parásitos pueden ser encontrados en localizaciones inusuales; en cambio, los niveles de anticuerpos tienden a ser más bajos. Consecuentemente, las pruebas basadas en la detección del parásito o sus componentes (examen microscópico, cultivo o PCR de muestras de sangre o de aspirados de la médula ósea) son más sensibles que en los pacientes inmunocompetentes. La prueba de látex para la detección de antígenos en orina también ha mostrado en estos pacientes una alta sensibilidad. Por el contrario, la sensibilidad de las técnicas serológicas está disminuida en los pacientes coinfectados.^[32]

_____ *Antecedentes* _____

Debido a la inexistencia de medicamentos seguros, eficaces y costeables, así como para evitar el desarrollo de resistencia parasitaria, el **tratamiento** debe instaurarse solo una vez que el diagnóstico ha sido confirmado. No obstante, cuanto más temprano se inicie la terapia mayores son las probabilidades de recuperación del paciente y menor su participación en el mantenimiento del ciclo de transmisión de la enfermedad.

Existen pautas internacionales para el tratamiento de las distintas formas de leishmaniosis en cada zona geográfica; aunque al final, este dependerá de una multiplicidad de factores entre los que se incluyen: la política nacional de salud (si existe), la disponibilidad de medicamentos, el precio del tratamiento (que no solo se refiere al del medicamento), el nivel de acceso del paciente al sistema de salud, entre otros.

D1.5. Problemática del tratamiento de la leishmaniosis

Los medicamentos disponibles para el tratamiento de la leishmaniosis distan de ser ideales debido a su alta toxicidad, baja eficacia y elevado precio.

Los efectos adversos asociados a los medicamentos anti-leishmaniales pueden ser tan severos que, en algunos casos, comprometen la vida del paciente. Se suma la incomodidad relacionada con la hospitalización, pues la mayoría de ellos requieren administración endovenosa con supervisión médica.

La eficacia de los medicamentos es variable según la especie de *Leishmania* y, luego de décadas de uso continuado, el desarrollo de resistencia parasitaria se ha convertido en un grave problema.

La terapia muchas veces no es costeable por el paciente. Además del precio del medicamento, el paciente debe incurrir en gastos adicionales relacionados con su transportación hacia el centro de salud, el diagnóstico, la hospitalización y otros tratamientos concomitantes. Los nuevos formulados que poseen mejor perfil de seguridad/eficacia tienen precios que no pueden ser pagados por la mayoría de la población afectada. Afortunadamente, existen países en los que, gracias a la

cooperación internacional de organizaciones humanitarias, se logran ciertos niveles de cobertura de la demanda de medicamentos a precios módicos.

Ante la incapacidad de acceder a un tratamiento adecuado por razones económicas, por las insuficiencias de los sistemas de salud o por vivir el paciente en zonas remotas e intrincadas, es frecuente que los enfermos acudan a remedios caseros que en muchas ocasiones son tan ineficaces como tóxicos. El enfermo se ve imposibilitado de trabajar y buscar sustento para él y su familia, por lo que la enfermedad es una agravante para la pobreza ya existente.

La leishmaniosis cutánea cura espontáneamente, no compromete la vida del paciente y las complicaciones secundarias severas son poco frecuentes. No obstante, las infecciones secundarias pueden complicar notoriamente las lesiones ulceradas. Existen condiciones en las que no se recomienda el tratamiento para evitar los efectos adversos asociados a la medicación y evadir el desarrollo de resistencia parasitaria, a la vez que se favorece la inducción de una respuesta inmune duradera.

Solo es aceptable usar un tratamiento con riesgos de provocar efectos adversos severos en pacientes de leishmaniosis cutánea si las lesiones son numerosas (más de cuatro), desfigurantes o deshabilitantes (cara, articulaciones, dedos de las manos o los pies), si están próximas a los ojos o grandes vasos sanguíneos, si su tamaño o localización imposibilitan el tratamiento local, si este ya ha sido aplicado infructuosamente o si el paciente se encuentra inmunosuprimido.

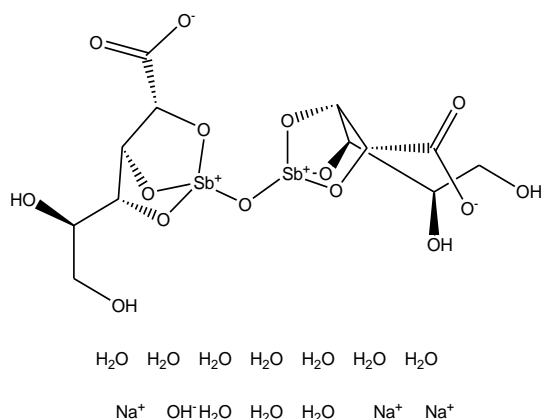
D1.5.1 Fármacos en uso, indicaciones e inconvenientes

Los **derivados de antimonio pentavalente (Figura 4)** incluyen al estibogluconato de sodio (Pentostam[®]) y al antimoniato de meglumina (Glucantime[®]). Tanto su eficacia como la toxicidad dependen del contenido de antimonio. Durante muchos años, estos han sido los fármacos de primera línea para el tratamiento de la leishmaniosis en casi todo el mundo. Se dosifican a razón de 20 mg/kg de Sb^V por vía endovenosa o intramuscular por períodos que van desde 10 hasta 45 días, en dependencia de la

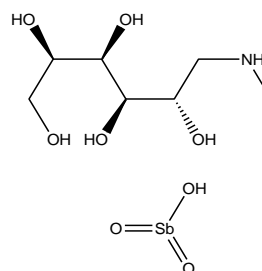
____ Antecedentes ____

forma clínica y la localización geográfica.^[32] También se emplean por infiltración local en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea.

En general, su eficacia es alta, aunque el desarrollo de resistencia parasitaria ha sido una preocupación en los focos de leishmaniosis visceral en el norte de Bihar (India) y Nepal donde la eficacia ha decrecido sustancialmente. Para mantenerla, se ha recomendado en algunas localidades incrementar la dosis y la duración del tratamiento, en detrimento de la seguridad del medicamento.^[45, 46]



Estibogluconato de Sodio



Antimoniato de Meglumina

Figura 3: Estructura química de los derivados de antimonio pentavalente usados para el tratamiento de la leishmaniosis

Los efectos adversos más serios asociados al tratamiento con antimoniales son la cardiotoxicidad, la hepatotoxicidad y la pancreatitis, pudiendo llegar a ser mortales. También pueden producir astenia, mialgia, náuseas, dolor abdominal, dolor de cabeza, incremento de las enzimas hepáticas, leucopenia, anemia y trombocitopenia.^[16] Su uso no es recomendable durante la gestación debido a que puede producir aborto, parto prematuro y encefalopatía hepática en la madre.^[32]

Los derivados de antimonio pentavalente también se inyectan intralesionalmente en pacientes con leishmaniosis cutánea no complicada. Mediante este procedimiento se ha logrado una alta eficacia con un mínimo de efectos adversos.^[47, 48]

La **pentamidina** es una diamidina aromática (**Figura 5**) que ha sido empleada en casos de leishmaniosis visceral y mucocutánea resistentes a los antimoniales o en individuos intolerantes a estos. En Brasil se ha usado en infecciones por *L. guyanensis*, pues generalmente responden mal a los antimoniales.^[16] Se administra intramuscularmente o, preferiblemente, por infusión intravenosa; sin embargo, el uso de la pentamidina está limitado por sus serias y prolongadas reacciones adversas que incluyen diabetes mellitus, hipoglicemia severa, arritmia, shock, miocarditis y pancreatitis.^[49]

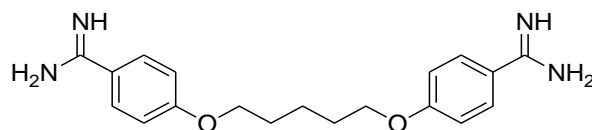


Figura 4: Estructura química de la pentamidina

La **anfotericina B** es un macrólido polieno (**Figura 6**) primariamente desarrollado por su acción antimicótica^[50] y, debido a su potente actividad frente a todas las especies de *Leishmania*, ha resultado también de gran utilidad en el tratamiento de la leishmaniosis visceral, en casos de falla terapéutica con antimoniales y en otras formas clínicas refractarias de leishmaniosis. Si bien se ha descrito sensibilidad variable entre las especies (siendo *L. mexicana* la menos sensible), ninguna especie se considera resistente.^[46, 51]

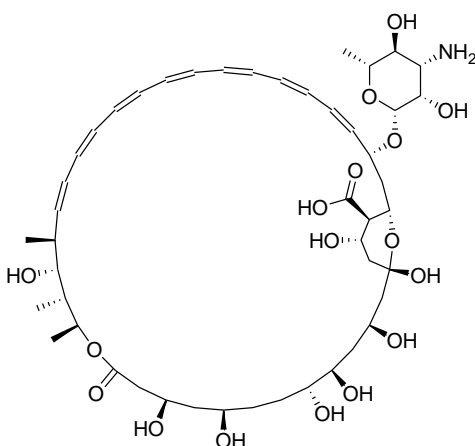


Figura 5: Estructura química de la Anfotericina B

_____ Antecedentes _____

La anfotericina B tiene afinidad por los esteroides de la membrana citoplasmática y de ello depende no solo su actividad sino también los efectos adversos que provoca. Sin embargo, su afinidad por el colesterol, propio de las células de los mamíferos es inferior a la que tiene por el ergosterol presente en las membranas de los hongos y de *Leishmania* spp. Es por ello que, incluso con cierta toxicidad asociada, ha resultado de utilidad médica como antimicótico y anti-leishmanial.

Su biodisponibilidad oral es muy baja y, aun cuando se han realizado intentos para desarrollar una formulación de uso tópico, ninguna ha llegado a ensayos clínicos. Las formulaciones existentes son de administración endovenosa y requieren hospitalizar al paciente para monitorear las reacciones adversas. Las más frecuentes están relacionadas con la inyección del medicamento e incluyen fiebre, escalofríos, temblores y tromboflebitis de la vena inyectada. Comúnmente produce nefrotoxicidad, causa habitual de interrupción del tratamiento. Otros efectos tóxicos menos frecuentes, pero graves, son la miocarditis y la hipokalemia.^[32]

La formulación de anfotericina B más utilizada es una dispersión en desoxicolato de sodio (Fungizone®). Sin embargo, se han desarrollado otras con similar eficacia y mejor perfil de toxicidad. De ellas, la anfotericina B liposomal (Ambisome®) se ha registrado como tratamiento anti-leishmanial de primera línea en varios países, fundamentalmente para el tratamiento de la leishmaniosis visceral y mucocutánea, así como en pacientes co-infectados con VIH.

Durante mucho tiempo se ha usado la anfotericina B en el tratamiento de las micosis. Sin embargo, rara vez se ha descrito el surgimiento de cepas de hongos resistentes y dicha resistencia ha estado limitada a la especie en cuestión.^[50] Si bien en la actualidad no es un problema real, se ha demostrado experimentalmente que sí es posible el desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp con resistencia a la anfotericina B.^[52] Con el uso incrementado de las formulaciones liposomales, cuyo tiempo de vida media es más largo, puede ser mayor el riesgo de aparición de cepas resistentes en condiciones clínicas.^[46]

La **miltefosina** es un alquilfosfolípido (hexadecilfosfocolina) (**Figura 7**) originalmente desarrollado como antineoplásico. Posteriormente se demostró su acción anti-leishmanial^[53] y contra *T. cruzi* y *T. brucei*.^[54] Hasta la fecha es el único medicamento disponible para el tratamiento de la leishmaniosis que se administra por vía oral. Su eficacia clínica frente a la leishmaniosis visceral en niños y adultos en la India fue del 94%.^[55] y, extendiendo a 12 semanas el tratamiento, mostró una eficacia del 96.6% frente a la leishmaniosis dérmica post-kala-azar.^[56] Sin embargo, se ha podido comprobar que la frecuencia de recaídas en estos pacientes es alta, al igual que la tendencia al desarrollo de resistencia parasitaria a la miltefosina.^[57]

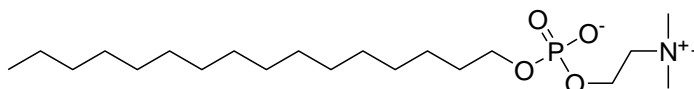


Figura 6: Estructura química de la Miltefosina

La miltefosina ha demostrado un 70-90% de eficacia en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea por *L. panamensis*; pero se considera poco eficaz si la enfermedad es causada por *L. braziliensis* o *L. mexicana*.^[32] En general, los resultados clínicos frente a la leishmaniosis cutánea del Nuevo Mundo han sido variables, considerándose la razón primordial la distinta susceptibilidad de las cepas y especies circulantes en cada localidad.^[58]

Uno de los problemas fundamentales asociados a la terapia con miltefosina ha sido su teratogenicidad, por lo cual no se recomienda utilizar durante el embarazo y requiere de anticonceptivos en las mujeres fértiles durante el tratamiento. El uso de anticonceptivos debe extenderse hasta tres meses después de culminado el tratamiento debido a la larga persistencia de la miltefosina en el organismo. Además, los efectos adversos de tipo gastrointestinal (anorexia, náuseas, vómitos, diarrea) limitan frecuentemente el cumplimiento de la pauta del tratamiento oral consistente en, al menos, 28 días consecutivos.

También se ha empleado el **ketoconazol** y otros **azoles** con diverso grado de eficacia. Los más estudiados clínicamente han sido ketoconazol, itraconazol y fluconazol (**Figura**

Antecedentes

8). De ellos, el ketoconazol ha sido el que mejores resultados ha mostrado en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea, siendo comparables a los antimoniales en un metanálisis.^[59]

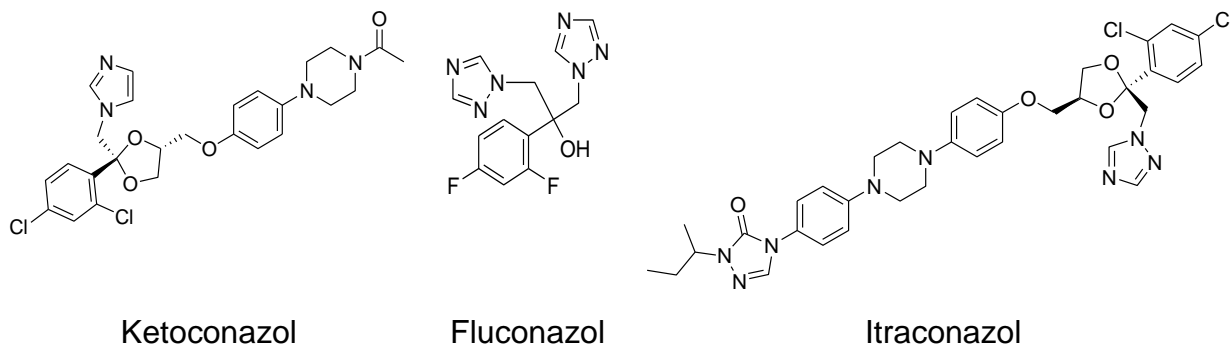


Figura 7: Estructura química de algunos azoles

El sulfato de **paromomicina** o **aminosidina** es un antibiótico aminoglucósido, (**Figura 9**) estructuralmente similar a la neomicina, que ha sido empleado como anti-leishmanial por vía intramuscular y tópicamente.

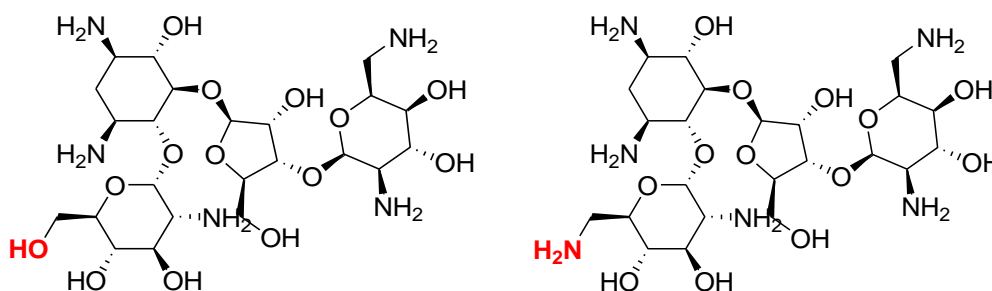


Figura 8: Estructura química de la paromomicina y la neomicina

La eficacia del sulfato de paromomicina frente a la leishmaniosis visceral en la India (15 mg/kg, 21 d) ha sido de 93-95%; mientras que en el Este de África (20 mg/kg, 21 d) resultó de un 85%. Sin embargo, no existe experiencia sobre su uso clínico frente a *L. infantum* (Mediterráneo y Suramérica).

La experiencia en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea con paromomicina inyectable en Colombia y Belice demostró valores de eficacia inferiores al 60%. Su uso en esta forma de la enfermedad ha sido primordialmente con formulaciones tópicas.

El dolor en el sitio de la inyección es el efecto adverso más frecuente (55%); puede producir además ototoxicidad reversible (2%) y, raramente, toxicidad renal y hepática.^[32] En pacientes con leishmaniosis cutáneas, estas reacciones adversas se pueden evitar con los formulados para administración tópica; pero, debido a la baja permeabilidad cutánea de la paromomicina se han tenido que ensayar varias formulaciones. De ellas, las más avanzadas clínicamente son las que además contienen urea, cloruro de metilbenzetonio o gentamicina.

El preparado de más reciente desarrollo y con un perfil aparentemente más adecuado de toxicidad/eficacia es el que contiene 15% de paromomicina y 0.5% de gentamicina. En un ensayo clínico controlado aleatorizado a doble ciegas llevado a cabo en Túnez para el tratamiento de leishmaniosis cutánea por *L. major* esta formulación tuvo un 81% de eficacia^[60] y en Panamá también se obtuvieron resultados similares (87%) en pacientes infectados con *L. panamensis*.^[61]

Para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea no complicada se han desarrollado otros tratamientos locales como la termoterapia, la crioterapia y la terapia fotodinámica. De ellos, la termoterapia (1-2 sesiones, 50 °C, 30 s) y la crioterapia con nitrógeno líquido han sido los más empleados clínicamente.^[62] La combinación de crioterapia e infiltración con antimoniales pentavalentes también ha sido recomendada por su eficacia superior a cualquiera de ellas dos por separado.^[63, 64] El inconveniente fundamental de estas técnicas radica en la necesidad de cierto equipamiento especializado; el cual, generalmente, no está disponible en las zonas rurales de alta prevalencia de la enfermedad.

D2. Tripanosomiasis americana

La tripanosomiasis americana, también conocida como Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis del Nuevo Mundo, es una enfermedad infecciosa y potencialmente mortal causada por el protozoo parásito flagelado *Trypanosoma cruzi*.^[4, 65]

T. cruzi puede existir en cuatro estadios morfológicamente distinguibles: tripomastigote, epimastigote, promastigote y amastigote (**Figura 10**). Las diferentes formas se

____ Antecedentes ____

diferencian entre sí por la posición del kinetoplasto en relación al núcleo y por la presencia o ausencia de una membrana ondulante:

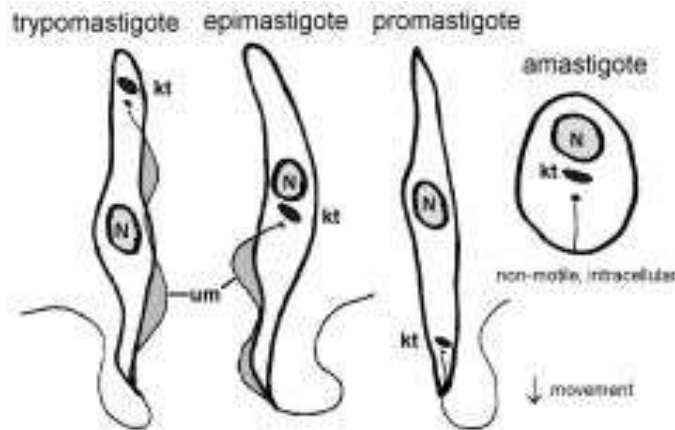


Figura 9: Morfología de los distintos estadios de *T. cruzi*.^[66] kt: kinetoplasto; N: núcleo; um: membrana ondulante

- En el trypomastigote el kinetoplasto se encuentra localizado posterior al núcleo, usualmente en la porción más posterior del parásito. El flagelo sale del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del parásito, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emerge en forma libre en su extremo anterior.
- En el epimastigote, el kinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana ondulante más pequeña que la observada en los trypomastigotes.
- El promastigote tiene el kinetoplasto en la parte anterior y un flagelo libre sin membrana ondulante.
- El amastigote es más esférico y no tiene flagelo libre. El kinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo.

D2.1. Taxonomía

La taxonomía de *T. cruzi* y *Leishmania* spp coinciden hasta el nivel de familia (*Trypanosomatidae*). Ambos son del orden *Kinetoplastida*, que incluye organismos flagelados con un kinetoplasto, o sea, un organelo localizado en la mitocondria celular que contiene una red fibrosa de ADN y que se ubica en las proximidades del origen del flagelo. El subgénero al que pertenece *T. cruzi* (*Schizotrypanum*) se ubica en la sección *Stercoraria* junto a otros subgéneros de tripanosomas, cuyos estadios infectantes se desarrollan en el tracto digestivo del vector y este contamina al hospedero mamífero con sus heces fecales. Entre ellos, el subgénero *Schizotrypanum* se ha adoptado para los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados a través de estadios intracelulares. De este modo, el nombre taxonómico completo de *T. cruzi* es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (**Figura 11**).

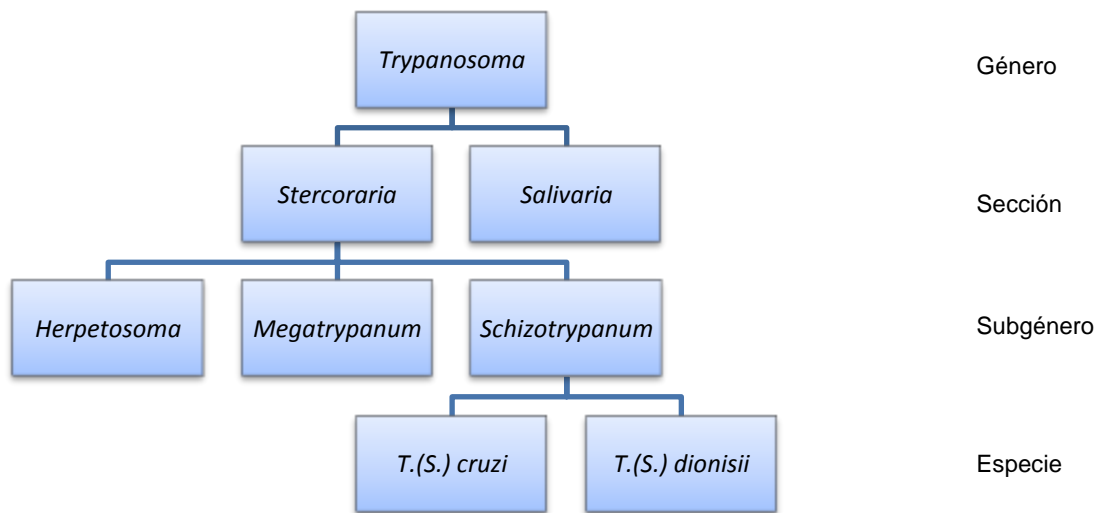


Figura 10: Clasificación taxonómica detallada *T. cruzi* dentro del género *Trypanosoma*^[67]

D2.2. Ciclo biológico

T. cruzi tiene un ciclo biológico complejo en el que además del hombre, las diversas especies de insectos vectores y el parásito en sus distintos estadios (**Figura 12**) pueden intervenir otras especies vertebradas que actúan como reservorios naturales.

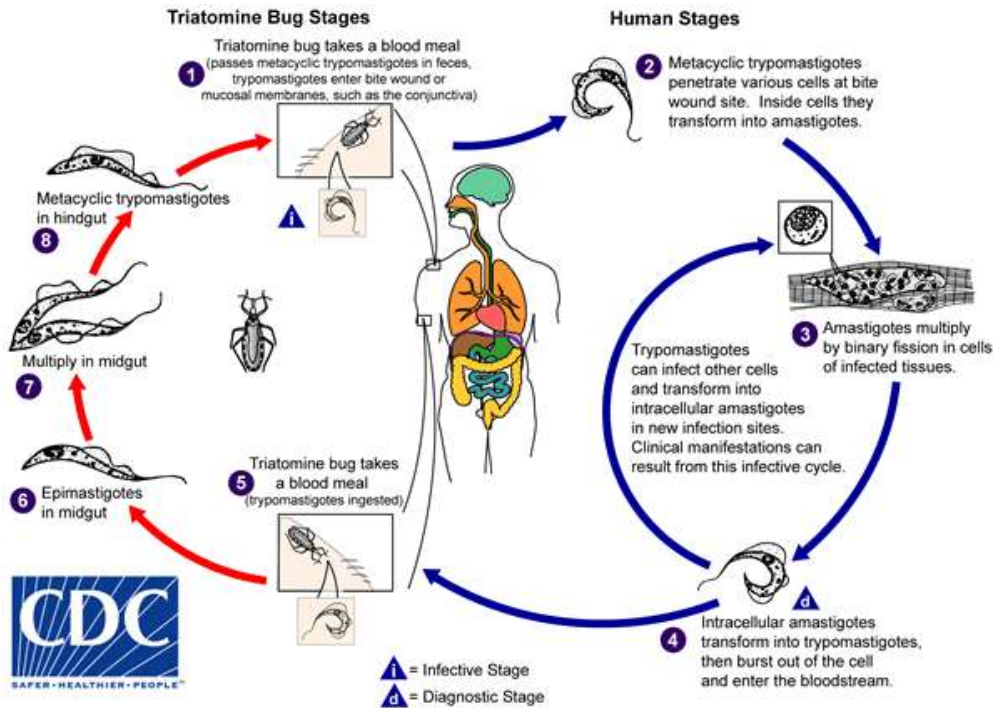


Figura 11: Ciclo biológico de *T. cruzi*.^[68] Un insecto vector triatomino infectado pica y succiona sangre al tiempo que libera los **trypomastigotes** con sus heces fecales cerca del sitio de la picadura. Los trypomastigotes también pueden entrar al hospedero a través de heridas cutáneas o de las membranas mucosas intactas, tales como la conjuntiva **1**. Comúnmente, las especies de triatominos vectores pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*. En el hospedero los trypomastigotes invaden las células próximas al sitio de entrada, donde se diferencian en **amastigotes intracelulares** **2**. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria **3**, se diferencian en trypomastigotes, y entonces son liberados al torrente sanguíneo como **trypomastigotes sanguíneos** **4**. Estos no se replican (a diferencia de los tripanosomas africanos). En cambio, infectan células de varios tipos de tejidos y se transforman nuevamente en **amastigotes intracelulares** en los nuevos sitios de infección. Las manifestaciones clínicas pueden ser el resultado de este ciclo de infección. El insecto se infecta al alimentarse de la sangre de un humano o animal que contenga parásitos circulantes **5**. En el intestino medio del vector los **trypomastigotes** se transforman en **epimastigotes** **6**, donde además se multiplican **7** para luego diferenciarse en **trypomastigotes metacíclicos** infectantes en el intestino posterior **8**. *T. cruzi* también puede transmitirse por la ingestión de alimentos contaminados con las heces u orina de los vectores infectados, por transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, vía transplacentaria, durante el parto (de una madre infectada a su hijo), por accidentes de laboratorio o al compartir agujas hipodérmicas.

D2.3. Vectores y reservorios

La infección se transmite vectorialmente por insectos triatominos de la familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera* (chinchas), subfamilia *Triatominae*. De estos se conocen cerca de 130 especies agrupadas en 16 géneros. Solo unas pocas especies pertenecientes a tres géneros (*Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*) tienen importancia como vectores de *T. cruzi* entre los animales domésticos y los humanos en áreas endémicas. Estos tres géneros están ampliamente distribuidos en las Américas, desde México hasta Argentina y Chile. Las otras especies de triatominos tienen una distribución más amplia (desde el Norte de EE.UU. hasta la Patagonia).^[69] Sin embargo, las especies epidemiológicamente relacionadas con la enfermedad de Chagas son aquellas que se han adaptado al ambiente humano. Las cinco especies a las que se les ha concedido mayor relevancia como vectores de *T. cruzi* han sido: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *T. dimidiata*, *Panstrongylus megistus* y *T. braziliensis*.^[67]

Estos insectos pueden encontrarse en las grietas de las paredes o techos de las casas construidas con escasos recursos en áreas rurales o suburbanas. Normalmente se ocultan durante el día y son activos en la noche, siendo este el horario que prefieren para alimentarse de sangre al picar a los humanos. Por lo común, pican en un área de piel expuesta, como la de la cara, defecando en ese momento cerca de la picadura. Los parásitos entran al cuerpo cuando la persona instintivamente se frota la picadura y esparce las heces o la orina contaminada del insecto hacia el pequeño orificio de la picadura, los ojos, la boca o cualquier otra lesión cutánea existente.

Se describen además abundantes reservorios silvestres, domésticos y peridomésticos. Entre los identificados se encuentran armadillos, zarigüeyas, ratones, ratas, ardillas, murciélagos frutícolas, perros, gatos, martas, burros y cerdos. La convivencia de algunas de estas especies con el hombre al tiempo que mantienen movilidad en el ambiente peridomiciliario favorece el mantenimiento del ciclo de transmisión del parásito al humano.^[70, 71]

D2.4. Formas clínicas

La enfermedad de Chagas se presenta en tres formas clínicas: aguda, indeterminada y crónica. Sin embargo, algunos autores se refieren a la forma indeterminada como una fase de la forma crónica. Esta etapa también se conoce como forma crónica asintomática. El periodo de incubación varía según la vía de infección, siendo más corto si es por vía oral (5 días) o vectorial (5-14 días) en comparación con la infección a través de transfusiones de sangre (30-110 días).

La fase inicial o **aguda** de la enfermedad de Chagas puede presentarse a cualquier edad, aunque con mayor frecuencia ocurre en niños de 1-5 años y su duración es de cuatro a ocho semanas.^[67] La mayoría de los casos son asintomáticos o los síntomas son leves. En esta etapa hay un intenso parasitismo en casi todos los órganos y los parásitos circulan abundantemente por el torrente sanguíneo, disminuyendo la parasitemia en la medida en que progresa la enfermedad.

Cerca del 50% de las personas infectadas presenta como primer signo visible característico un edema en el sitio de infección (chagoma de inoculación) o de ambos párpados de un ojo (Signo de Romaña, **Imagen 6**). Además, puede presentarse fiebre, dolor de cabeza, inflamación de los ganglios linfáticos, palidez, dolor muscular, disnea, dolor abdominal o del pecho, derrame pericárdico e insuficiencia cardíaca debido a la miocarditis. Los trastornos encefálicos, tales como meningoencefalitis, se presentan con menor frecuencia.

Debido a que el curso de la enfermedad es casi siempre asintomático o los síntomas son leves, el diagnóstico puede establecerse en menos del 10% de los casos.^[5] La letalidad durante esta etapa es fundamentalmente debido a complicaciones secundarias y se estima en 0.25-0.5%.^[73]



Imagen 6: Paciente con signo de Romaña, característico de la enfermedad de Chagas en su forma aguda (Foto: Dra. Paz Ma. Salazar Schettino, Dra. Martha Bucio Torres, Facultad de Medicina, UNAM)^[72]

La fase aguda es seguida por la **indeterminada**. En este periodo la mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos o pueden mostrar algún grado de daño cardíaco, evidenciado por una miocarditis mínima, pero persistente. Normalmente la infección solo puede detectarse por métodos serológicos o parasitológicos. Esta fase puede tomar 10-30 años o perdurar indefinidamente.^[5, 73, 74]

Luego de la fase indeterminada, aproximadamente el 30% de los pacientes desarrolla la **forma crónica** sintomática de la enfermedad. Durante este periodo, los parásitos se refugian primordialmente en el miocardio y en la musculatura digestiva. Cerca del 30% de ellos sufre trastornos cardíacos y hasta un 10% presenta problemas digestivos (engrosamiento del esófago o el colon), alteraciones neurológicas o mixtas.

La persona con enfermedad de Chagas en su forma crónica y afectaciones cardíacas presenta una variedad de síntomas que si bien no son específicos, orientan al

____ Antecedentes ____

diagnóstico. Las manifestaciones cardíacas más frecuentes incluyen arritmias, bradicardia, aneurismas ventriculares, insuficiencia cardíaca, tromboembolismo y muerte súbita. Se han propuesto cuatro mecanismos para explicar la patogenia de las alteraciones cardíacas en el curso de la enfermedad de Chagas, a saber: *i*) daño miocárdico dependiente del parásito; *ii*) daño del miocardio mediado por el sistema inmune, inducido por el propio parásito y por antígenos propios; *iii*) alteraciones en el sistema de control autónomo del corazón; y *iv*) anomalías microvasculares e isquemia, caracterizados por microespasmos, microtrombos, disfunción de las células endoteliales e incremento de la actividad plaquetaria.^[5, 75]

La **Figura 13** resume los distintos estados clínicos de la enfermedad y la posible transición entre ellas.

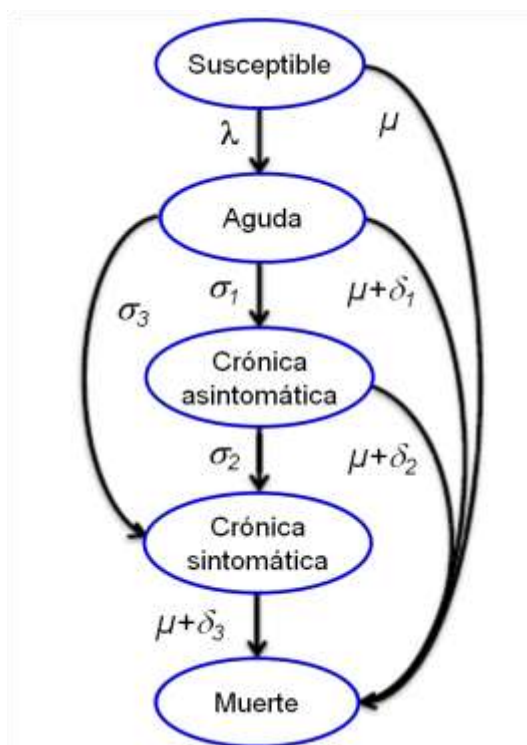


Figura 12: Modelo Markov básico para la enfermedad de Chagas. Los óvalos representan estados de salud y están unidos mediante probabilidades de transición; σ_x : probabilidades de transición entre estados. λ , fuerza de infección; μ , mortalidad general; $\delta_{1,2,3}$, mortalidad adicional en las fases (1) aguda, (2) crónica asintomática y (3) crónica sintomática ($\delta_2 \approx 0$).^[77]

De los pacientes que entran en la forma crónica, 60% muere entre siete meses y dos años de haber presentado los síntomas.^[4] La muerte puede ocurrir súbitamente por insuficiencia cardíaca a consecuencia de la destrucción progresiva del músculo cardíaco y su sistema nervioso^[76] o debido a complicaciones digestivas.

D2.5. Epidemiología

La transmisión vectorial de la Enfermedad de Chagas ocurre en áreas endémicas de 21 países latinoamericanos, incluyendo Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay y Venezuela.^[65] Según las distintas fuentes, se estima que 6-10 millones de personas padezcan la enfermedad de Chagas, se encuentran en riesgo de adquirir la infección 25-100 millones de personas con 56 000 nuevos casos anuales y 12-20 mil muertes/año.^[3-5] Actualmente, la enfermedad de Chagas es la causa fundamental de cardiomiopatía no-isquémica en América Latina.^[78]

La infección por *T. cruzi* existió en los animales salvajes y luego se extendió a los animales domésticos y el hombre, con una notable intensificación desde principios del Siglo XX. La diseminación de la enfermedad de Chagas hacia regiones no afectadas ha sido mayor en las dos últimas décadas que durante los más de 9000 años anteriores. Durante muchos años fue una enfermedad estrictamente rural. Sin embargo, los cambios socio-económicos, el éxodo rural, la deforestación y la urbanización han transformado el perfil epidemiológico, convirtiéndola en un fenómeno más urbano y peri-urbano.

En la actualidad la enfermedad de Chagas se presenta fundamentalmente en la parte continental de América Latina; pero sin incidir en las islas del Caribe. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado cada vez más en EE.UU., Canadá, Europa y Japón.^[65] La presencia de la enfermedad de Chagas fuera de Latinoamérica se debe al movimiento poblacional, fundamentalmente a la migración. También se han descrito casos de infección en viajeros que regresan de América Latina y en niños adoptados procedentes de esta región. La transmisión no vectorial subsiguiente tiene lugar

_____ Antecedentes _____

principalmente por transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos, de forma congénita o por accidentes de laboratorio.

La rápida diseminación del VIH durante los últimos 30 años, unida a los cambios de la epidemiología de la enfermedad de Chagas ha conducido a la emergencia de coinfecciones de *T. cruzi*/VIH. El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en individuos VIH-positivos es particularmente difícil. Cuando la enfermedad de Chagas se reactiva en un paciente seropositivo a VIH, se comporta como una enfermedad diferente, con características agudas tales como signos y síntomas neurológicos graves. Estos casos pueden confundirse con otras infecciones, siendo la toxoplasmosis el diagnóstico diferencial más importante a considerar. Por demás, las pruebas diagnósticas serológicas tradicionales para la enfermedad de Chagas resultan menos sensibles en estos pacientes, ya que su respuesta de anticuerpos frente a la infección es más débil.

D2.6. Control de la tripanosomiasis americana

No existe una vacuna clínicamente eficaz y segura para la prevención de la tripanosomiasis americana. Por consiguiente, el control vectorial ha sido el método más efectivo para limitar la transmisión de la enfermedad mediada por vectores en América Latina. Asimismo, los análisis de la sangre han resultado cada vez más importantes en el control de la transmisión por transfusiones de sangre y trasplantes de órganos.

La OMS ha recomendado^[65] las siguientes medidas para la prevención y el control de la enfermedad de Chagas:

- 1) Fumigación de las casas y áreas circundantes con insecticidas;
- 2) Mejoramiento de las casas para prevenir la infestación por los vectores;
- 3) Medidas personales preventivas tales como el uso de mosquiteros;
- 4) Buenas medidas higiénicas en la preparación, transportación, almacenamiento y consumo de alimentos;
- 5) Análisis a los donantes y receptores de sangre, órganos, tejidos o células;
- 6) Análisis a los recién nacidos y otros hijos de madres infectadas para brindarles diagnóstico y tratamiento tempranos.

A pesar de la compleja situación epidemiológica, en los últimos años se ha logrado la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *Rhodnius prolixus* en América Central (Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Nicaragua, Honduras) y México. También se ha logrado interrumpir la transmisión por *Triatoma infestans* (el principal vector intradomiciliario) en cinco provincias argentinas (Entre Ríos, Jujuy, La Pampa, Neuquén y Río Negro), la Región Oriental de Paraguay, dos departamentos en el Sur de Perú (Moquegua y Tacna), además de Brasil, Chile y Uruguay.

Además se ha logrado la implementación del análisis de sangre en todos los bancos de sangre para detener la transmisión vía transfusional en veinte de los veintiún países donde la enfermedad es endémica.

En sus trabajos originales Chagas abogaba por el mejoramiento de las condiciones de las viviendas en las áreas endémicas como principal vía para eliminar la enfermedad. Sin embargo, en la actualidad los problemas habitacionales y la falta de control vectorial siguen siendo un serio inconveniente. La enfermedad sigue afectando de forma desigual a las personas que viven en extrema pobreza y no pueden acceder al tratamiento y a cuidados médicos, por lo que la falta de atención médica propaga el ciclo vicioso de enfermedad-pobreza en las áreas endémicas.^[78]

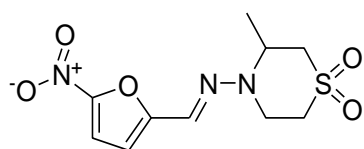
D2.7. Problemática del tratamiento de la tripanosomiasis americana

Las Organizaciones Panamericana y Mundial de la Salud^[79] propusieron que un medicamento ideal para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas debería cumplir los siguientes requisitos: (i) producir cura parasitológica tanto en la fase aguda como en la crónica; (ii) ser eficaz en tratamientos cortos, preferiblemente en dosis única o en unas pocas dosis y sin necesidad de hospitalización; (iii) ser de bajo costo; (iv) no tener efectos adversos colaterales o teratogénicos; y (v) no inducir la selección de cepas resistentes de *T. cruzi*. Sin embargo, ninguno de los compuestos probados hasta la fecha ha satisfecho esta lista de requisitos.^[4]

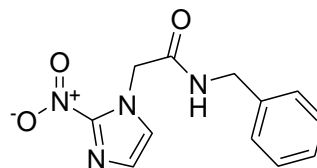
Solamente existen dos medicamentos licenciados (**Figura 14**) para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, el benznidazol y el nifurtimox.^[4] Ambos son parasiticidas frente

____ Antecedentes ____

a todas las formas del parásito^[5] y su eficacia es casi del 100% si se administran tempranamente durante el inicio de la fase aguda, incluso en los casos de transmisión congénita. No obstante, su eficacia se va haciendo menor mientras más tiempo transcurre entre la infección y el inicio de la terapia. Asimismo, existen cepas de susceptibilidad reducida a estos medicamentos, lo cual limita su eficacia y uso.^[80]



Nifurtimox



Benznidazol

Figura 13: Estructura química de los anti-chagásicos en uso clínico

El tratamiento también se recomienda en pacientes cuya infección se ha reactivado (por ejemplo, debido a inmunosupresión) y durante el inicio de la fase crónica. Se indica además en adultos infectados, especialmente los asintomáticos, debido a que puede prevenir o controlar el progreso de la enfermedad. En estos últimos se deberán considerar los posibles beneficios, pero también el largo período de tratamiento (hasta 2 meses) y las reacciones adversas que se presentan hasta en el 40% de los pacientes.^[65]

Luego de años de controversia, actualmente se sugiere el uso del benznidazol en los pacientes con la forma crónica de la enfermedad,^[5, 81] con la excepción de los pacientes con más de 55 años o con cardiomiopatía avanzada e irreversible.^[82, 83] Este cambio de proceder se debe, en parte, a los resultados de varios ensayos clínicos longitudinales, abiertos, no-aleatorizados que han mostrado una disminución significativa en la progresión de la cardiomiopatía y una tendencia a la disminución de la mortalidad en adultos tratados con benznidazol en comparación con los pacientes no tratados.^[83, 84] Se encuentra en fase de terminación el ensayo clínico BENEFIT (Acrónimo derivado de “*The Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis*”, ClinicalTrials.gov number, NCT00123916), ensayo multicéntrico, a doble-ciegos, aleatorizado, de

benznidazol *versus* placebo, en que se evalúa fundamentalmente la progresión clínica de la miocardiopatía.^[85]

El benznidazol y el nifurtimox no deben ser tomados durante el embarazo o por personas con insuficiencia renal o hepática. También se contraindica el nifurtimox en pacientes con antecedentes de trastornos neurológicos o psiquiátricos. Aquellos con manifestaciones cardíacas o digestivas pueden requerir tratamiento adicional para estos padecimientos.^[65]

Como mecanismos de acción se describe que el benznidazol induce la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos en el interior del parásito y provoca lesiones en el ADN mitocondrial. Por su parte, el nifurtimox induce estrés oxidativo en el parásito, activa la reducción por una nitrorreductasa eucariótica tipo I, inhibe la actividad deshidrogenasa del parásito y afecta el potencial de membrana mitocondrial. La baja especificidad bioquímica de estos modos de acción contribuye a la citotoxicidad y los efectos adversos observados durante la terapia.^[4]

Los efectos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con nifurtimox son anorexia, pérdida de peso, somnolencia, náuseas, vómitos y dolores intestinales. En el caso del benznidazol pueden clasificarse en tres grupos: (i) hipersensibilidad (dermatitis, con rash que aparece normalmente entre el séptimo y décimo día de tratamiento, edema periorbital o generalizado, fiebre, linfadenopatía, dolor muscular y articular); (ii) depresión de la médula ósea (neutropenia, agranulocitosis y trombocitopenia); y (iii) neuropatía periférica (parestesia y polineuritis).^[86]

Más allá de las conocidas deficiencias de los medicamentos disponibles, la falta de compromiso de los gobiernos y sus respectivos ministerios de salud pública con los sectores sociales más pobres tiene el más grave impacto. Ni siquiera en países latinoamericanos con una fuerte economía, como Brasil, se garantiza el suministro de los medicamentos actualmente disponibles (nifurtimox/benznidazol) para tratar los casos que lo requieren.

D3. Enfoques para la búsqueda de medicamentos destinados a la leishmaniosis y la tripanosomiasis americana

La leishmaniosis y la Enfermedad de Chagas son padecimientos al margen del interés de las compañías farmacéuticas. Solo por iniciativa de instituciones académicas, así como de organizaciones humanitarias y no-gubernamentales sin fines de lucro (OMS, TDR, MSF, DNDi, entre otras) se han logrado importantes progresos en el control de estas y otras enfermedades olvidadas y, en particular, el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. No obstante, sobre la base del limitado financiamiento disponible y la población a que va destinado el medicamento final, todo proyecto orientado a la investigación de nuevos tratamientos para estas enfermedades debe considerar estrategias económicas de desarrollo y que el producto resultante sea del costo mínimo.

Por las razones anteriores se insiste en el uso racional y eficiente de los recursos financieros y las capacidades disponibles en este campo. No solo el financiamiento de proyectos de investigación ha sido una prioridad; se han fomentado alianzas entre las universidades y la Industria Farmacéutica para acelerar el desarrollo priorizado de productos de interés; se ha promovido la formación del personal y las capacidades de investigación en países donde las enfermedades son endémicas; se han designado centros especializados en los distintos sistemas de ensayo; se han normalizado metodologías y se han dictado normas en aspectos medulares como las buenas prácticas clínicas, la bioseguridad, la bioética; se han hecho recomendaciones para el diseño de ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades específicas; y se han definido los perfiles de desarrollo de producto para las enfermedades olvidadas, entre otras muchas acciones de marcada significación estratégica.

El reposicionamiento de fármacos resalta entre los enfoques para el descubrimiento de nuevas alternativas terapéuticas para las enfermedades parasitarias olvidadas. Consiste en explorar entre los medicamentos aprobados o en fases avanzadas de desarrollo para otras indicaciones, aprovechando la información disponible de los productos. También es aplicable a fármacos que hayan demostrado seguridad en

ensayos clínicos y que no resultaron eficaces para la indicación primaria para la cual fueron desarrollados.^[11, 12]

Un compuesto reposicionado puede avanzar rápidamente desde los ensayos primarios de actividad hacia su nominación como candidato a fármaco y los ensayos clínicos (**Figura 15**). Se dispondrá de la información físico-química, la analítica, los estudios toxicológicos pre-clínicos, la seguridad clínica, los estudios farmacocinéticos, de estabilidad, de formulación e interacciones; los cuales representan un gasto sustancial en el proceso de desarrollo del fármaco. Consiguientemente, para la nueva indicación solo se requiere demostrar la actividad en el laboratorio, así como en modelos animales de la enfermedad, y entonces ejecutar los ensayos clínicos según las nuevas condiciones de uso.



Figura 14: Esquema comparativo del camino a recorrer por un fármaco en su desarrollo para la primera indicación (A) y al ser reposicionado (B). Adaptado de Kim, T.W.^[12]

El costo del fármaco reposicionado es aproximadamente el 60% de la inversión necesaria para su desarrollo como primera indicación. Ello representa un ahorro de unos 320 millones de dólares.^[13] Esta no es solo una estrategia económica, puesto que la probabilidad de fracaso en fases adelantadas del desarrollo del producto (que son las más caras) es también menor.

Existen múltiples ejemplos del éxito de esta estrategia. En el caso de la leishmaniosis, la indicación primaria de la anfotericina B y el ketoconazol fue como antimicóticos; la

paromomicina, es un antibiótico aminoglucósido; la miltefosina, un antineoplásico; la pentamidina se emplea para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis carinii* y de la tripanosomiasis africana; y el buparvaquone, originalmente registrado como medicamento para el tratamiento de la teileriosis bovina, se encuentra en fase de desarrollo para la leishmaniosis cutánea.^[87-90] Muchos otros ejemplos existen del reposicionamiento de fármacos para otras indicaciones diferentes a las enfermedades olvidadas, pero es para estas que tiene un impacto primordial por la escases de recursos disponibles para su desarrollo.

Otra estrategia que se ha valorado en los últimos años ha sido la combinación de medicamentos. Con ello se espera reducir la probabilidad de desarrollo de resistencia parasitaria, acortar la terapia, disminuir los costos y los efectos adversos y, en consecuencia, mejorar el cumplimiento del esquema terapéutico.^[91, 92] Esta estrategia ha sido también sugerida como alternativa para mejorar la eficacia de los dos únicos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.^[5]

Una variante de especial interés en el tratamiento de las distintas formas de leishmaniosis radica en la combinación de anti-leishmaniales e inmunomoduladores. Hasta ahora, los resultados más relevantes se refieren a la combinación de Imiquimod^[93-97] y de oligodeoxinucleótidos citosina-fosfato-guanosina (ODN CpGs) con anti-leishmaniales conocidos.^[98, 99] El uso de inmunomoduladores, cuya interacción es más bien con el hospedero que con el patógeno, tiene la ventaja adicional de que disminuye la probabilidad de desarrollo de resistencia parasitaria.^[100]

D4. Descubrimiento de medicamentos asistido por computadoras

Han transcurrido más de cincuenta años desde que Corwin Hansch hiciera los trabajos pioneros de modelación de las relaciones cuantitativas de estructura-actividad.^[101] La modelación QSAR ha crecido, se ha diversificado y ha evolucionado desde su aplicación a pequeñas series de compuestos congenéricos, usando métodos de regresión relativamente simples, hasta el análisis de grandes bases de datos, que incluyen desde decenas hasta cientos de miles de estructuras diversas y empleando una amplia gama de métodos estadísticos y técnicas de inteligencia artificial.^[102]

La modelación QSAR se utiliza en la academia, la industria e instituciones gubernamentales en todo el mundo. Luego de años de predominio de los métodos basados en estructuras, hoy se reconsidera positivamente el valor de los métodos QSAR basados en técnicas estadísticas como guía para la optimización molecular.^[103] Los modelos QSAR tienen una amplia aplicación para evaluar el impacto potencial de compuestos químicos, materiales y nanomateriales en la salud humana y los sistemas ecológicos.^[102] El uso con fines regulatorios por agencias gubernamentales es también un área de activo desarrollo.^[104]

La modelación QSAR es una disciplina esencialmente computacional, pero los beneficiarios principales y los jueces finales son los especialistas en Química Medicinal. La eficiencia del proceso de optimización molecular depende de cuán imbricados estén los esfuerzos de modeladores y químicos.^[102] No obstante, prácticamente en todas las fases de desarrollo de un fármaco, desde el cribado primario hasta la aprobación regulatoria, en mayor o menor medida, los modelos QSAR son aplicables.

De máxima relevancia es la modelación de la actividad *in vitro*^[15, 105, 106], la citotoxicidad,^[107, 108] la metabolización hepática^[109, 110], la biodisponibilidad oral o percutánea,^[111-113], la modelación de la absorción, distribución, metabolismo y excreción^[114]; la capacidad de atravesar la barrera hemato-encefálica,^[115-118] y la toxicidad *in vivo*,^[119, 120] entre muchas otras propiedades biológicas potencialmente modelables.

Un paso superior en la modelación QSAR se ha dado por el desarrollo de modelos híbridos que combinan descriptores moleculares y resultados experimentales obtenidos en modelos biológicos.^[121-124] Este avance se ha logrado gracias a la disponibilidad de información sobre la actividad biológica en múltiples sistema de ensayo para una gran diversidad de compuestos. Las ventajas fundamentales se han manifestado en un aumento de la exactitud en la predicciones, mejor interpretación de las propiedades más predictivas y un aumento de cobertura del espacio químico como resultado del incremento del dominio de aplicación.^[121, 124]

D4.1. Metodología para solucionar un problema de modelación QSAR

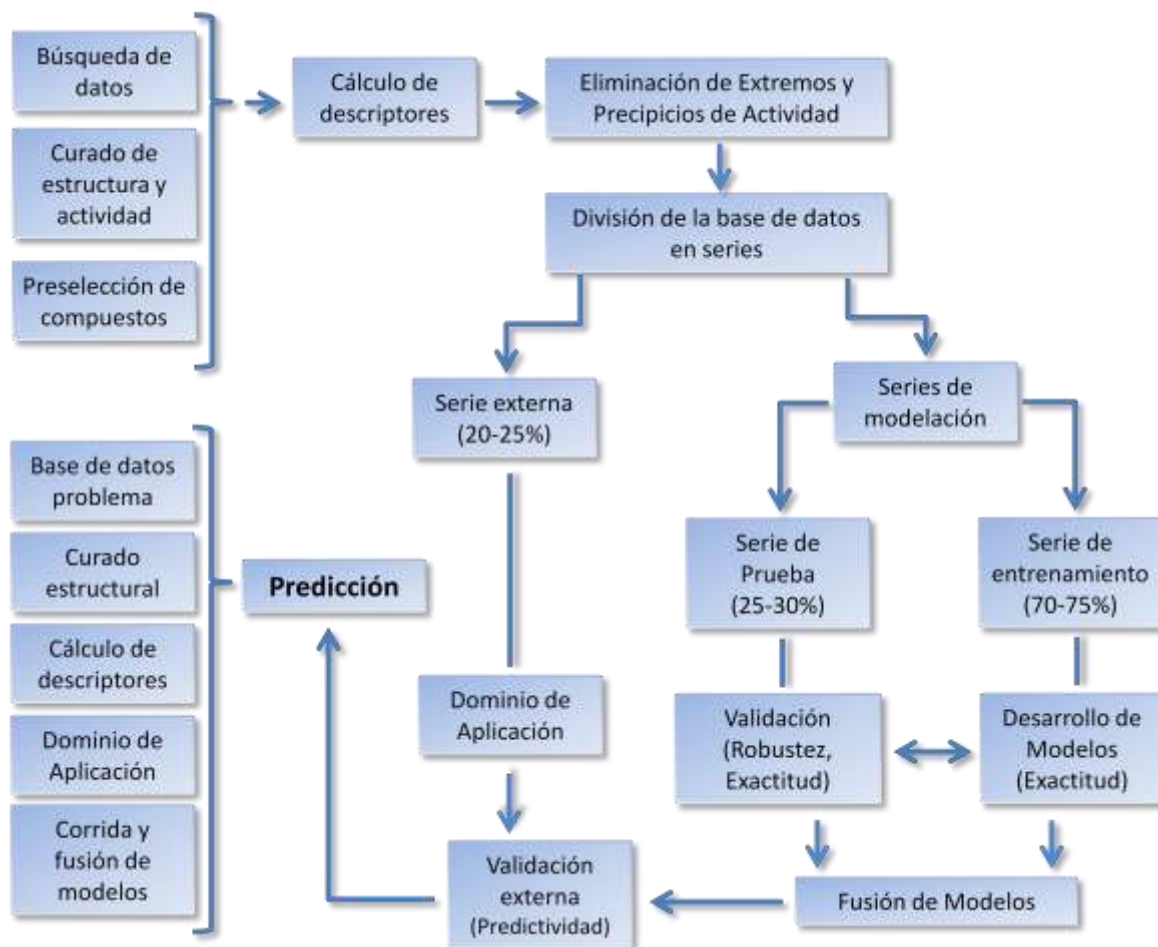


Figura 15: Diagrama para el desarrollo de un modelo QSAR

En la **Figura 16** se representa esquemáticamente la secuencia de pasos para solucionar un problema de modelación mediante estudios cuantitativos de relación estructura-actividad. En los acápites siguientes se profundizará en cada uno de los aspectos. No obstante, puede resumirse que el proceso inicia con la elección correcta de los datos y su minuciosa inspección para eliminar posibles errores.

Luego se seleccionan y segregan los compuestos en series que se emplearán para el desarrollo de los modelos (serie de entrenamiento) y su validación interna (serie de prueba) y externa (serie externa). Una vez demostrada la exactitud, robustez y valor predictivo de los modelos se pasa a la fase de predicción de compuestos de actividad

desconocida. Las nuevas moléculas reciben un manejo similar en cuanto al curado estructural; determinándose además si pertenecen al dominio de aplicación de los modelos, antes de considerar válidas las predicciones realizadas con ellos.

D4.1.1. Fuentes de datos

Como los modelos solo pueden ser tan buenos como los datos que se emplean para desarrollarlos, la calidad de estos es de importancia crítica.

En los inicios de los estudios QSAR la fuente fundamental de datos radicaba en los resultados publicados por grupos de investigación independientes. En consecuencia, la variabilidad intrínseca de la respuesta biológica medida era alta y la disponibilidad de información sobre compuestos inactivos también era escasa por la tendencia de los investigadores a no publicar estos resultados. En la actualidad, esta fuente sigue siendo válida, aunque se emplean herramientas de minería de texto para asistir y validar las búsquedas.^[125, 126]

En la actualidad, la fuente de datos fundamental se sustenta en bases de datos resultantes de la evaluación de grandes bibliotecas químicas mediante ensayos de alto rendimiento (HTS). De este modo, cientos de miles de compuestos son probados por un mismo laboratorio, por técnicas robotizadas de pipeteo, seguimiento, evaluación y hasta cálculo de la respuesta final. El error esperado en la respuesta biológica medida de esta forma es mínimo y la variabilidad observada es fundamentalmente explicable por los cambios en la estructura química.

La mayoría de los compuestos estudiados por HTS resultan inactivos; siendo, por ejemplo, la tasa de activos para *Leishmania donovani* (intracelular) de un 0.06% (0.02-0.09%) y para *T. cruzi* (intracelular) de 0.55% (0.03-0.85%).^[14] Estos valores dependen de los límites de corte fijados en cada caso; aunque, por la enorme cantidad de compuestos probados, comúnmente existe suficiente información químico-biológica y gran diversidad estructural para el desarrollo de modelos QSAR apropiados.

____ Antecedentes ____

En el caso de *Leishmania* existen dos bases de datos publicadas en PubChem Bioassay (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcassay>) y dos de *T. cruzi* cuyas generalidades se muestran a continuación:

Tabla 1: Bases de datos de compuestos probados frente a *L. major* y *T. cruzi* disponibles en internet

Base de datos	Estadio	Ensayados	Activos	Criterio de actividad
AID1063	<i>L. major</i> (promastigote)	196'444	17'620	IC _{10μM} >50%
AID1258	<i>L. major</i> (promastigote)	1'122	146	IC _{1μM} >50%
AID1885	<i>T. cruzi</i> (amastigote)	303'222	4394	IC _{6μM} >50%
AID2044	<i>T. cruzi</i> (amastigote)	4063	4014	CI ₅₀ <6μM

También se pueden encontrar bases de datos de menor escala desarrolladas por intereses particulares de optimización de algún quimotipo en específico. Sin embargo, los modelos derivados a partir de estos datos tienen una relevancia, en cierto modo, limitada a dicho patrón estructural.^[127-129]

D4.1.2. Curado de la base de datos

Un supuesto básico de cualquier estudio quimioinformático es la exactitud de los datos a partir de los cuales se generan los modelos. Sin embargo, se ha observado que, como promedio, hay dos errores en cada publicación de química medicinal, siendo la tasa de error general en los compuestos indexados en la base de datos WOMBAT del 8%.^[130, 131] Asimismo, luego de investigar varias bases de datos públicas y comerciales se ha comprobado que la frecuencia de errores oscila entre el 0.1% y el 3.4%.^[132] De ahí, la importancia de realizar una minuciosa inspección (curado) de los datos como primer paso en cualquier proyecto QSAR.

El curado de datos tiene como objetivo minimizar los errores en las estructuras químicas, así como en la actividad biológica que se le asocia. Si bien existen múltiples programas para el curado y homogeneización estructural, la identificación de errores en la actividad biológica es una tarea más difícil, ya que no existen algoritmos apropiados para ello.^[133]

El curado estructural se inicia con la eliminación de compuestos duplicados, sustancias inorgánicas, compuestos organometálicos, sales, mezclas y contraiones. Luego debe homogeneizarse la representación de las estructuras. Si bien es aceptable químicamente la representación de los grupos nitro de modos diversos, los valores calculados para algunos descriptores pueden variar según la forma en que este es representado. De igual manera sucede con los anillos aromáticos, los grupos nitroso, isocianato, diazo, fosfónico, sulfóxido, entre otros. Es por ello que en todas las moléculas los grupos estructurales iguales deben estar representados de un mismo modo. De lo contrario, las relaciones subyacentes de estructura-actividad se “oscurecen” y la calidad de los modelos resultantes no es comparable a la de la información disponible.^[134] Se ha comprobado que pequeños errores en las moléculas pueden conducir a cambios importantes en la exactitud y poder predictivo de los modelos.^[130]

Con relación a la actividad es preciso prestar atención a los criterios prefijados para clasificar un compuesto como activo, particularmente si se toman compuestos de distintas fuentes. Por otro lado, pueden existir errores en la anotación de la actividad, los cuales son más difíciles de detectar. Los compuestos que de forma consistente resultan mal clasificados por distintos modelos obtenidos a partir de datos cuidadosamente curados pueden representar una alerta de error.^[133] De hecho, se ha demostrado la utilidad de los modelos QSAR para identificar estos errores de anotación.^[134]

Otra forma de identificar este tipo de error es comparando la actividad de compuestos estructuralmente similares. Si bien existen verdaderos compuestos formadores de precipicios de actividad (ver más adelante), la revisión minuciosa de la información

disponible acerca de compuestos con similar estructura y muy distinta actividad puede revelar errores de anotación de la actividad del compuesto.^[134]

D4.1.3. Formación de las series de datos

Un paso crítico en el desarrollo de un modelo QSAR es la división de la base de datos que contiene información sobre la estructura química de los compuestos y su actividad en distintas partes o series. El propósito esencial es emplear un grupo de compuestos en la obtención del modelo y el resto para estimar su poder de predicción.

Distintos autores han denominado las series de modos diferentes, existiendo incluso contradicciones en los términos empleados. A lo largo del presente documento se emplea la siguiente terminología en consonancia con artículos recientes sobre este tema en específico.^[102, 133, 135, 136]

Serie de entrenamiento: Datos empleados para generar los modelos. Idealmente, debe contarse con un grupo grande de compuestos, con alto grado de diversidad molecular y que cubra un amplio rango de la propiedad que se va a modelar.

Serie de Prueba: También llamada serie de validación. Son los datos usados para estimar el error de predicción y comparar los distintos modelos. Estos datos no se usan de forma directa para ajustar los modelos, por lo que dan una medida independiente de su poder predictivo. No obstante, como los modelos son comparados y seleccionados empleando la serie de prueba, esta afecta de cierta manera qué modelo es el escogido, especialmente cuando existe un gran número de candidatos.

Serie Externa: Datos usados para estimar el error de predicción del modelo final. No se emplean para generar los modelos ni para seleccionar entre ellos. Si bien la serie externa ha sido metodológicamente la última en explicarse, es el primer grupo de compuestos que se selecciona. Normalmente se excluye de forma aleatoria un 20-25% de los compuestos de la base de datos para conformar la serie externa.

Una vez formada la serie externa, el resto de los compuestos se divide entre la serie de entrenamiento y la de prueba en una proporción que usualmente es de 70:30 a 80:20.

Mientras mayor es la proporción de compuestos en la serie de prueba (digamos 50:50) más similares son los indicadores de desempeño de los modelos en ambas series y por ende, más optimista la estimación de su poder predictivo. Igual ocurre mientras mayor similitud estructural existe entre los compuestos de ambas series.^[137]

La forma de ubicar los compuestos en la serie de entrenamiento o de prueba puede determinar cuan optimista, real o pesimista es la estimación del poder predictivo del modelo, a juzgar por el desempeño en la serie de prueba. El procedimiento de uso más generalizado es la selección aleatoria, ya sea ignorando la estructura de los compuestos o haciendo un análisis previo de conglomerados para escoger aleatoriamente los elementos dentro de cada conglomerado. Se han propuesto varios métodos para elegir los compuestos de la serie de prueba, pero se ha demostrado que no superan la selección aleatoria en cuanto al poder predictivo de los modelos obtenidos.^[136]

Recientemente, se ha propuesto que los compuestos se separen según la fecha en que fueron probados. Los primeros compuestos se asignan a la serie de entrenamiento y los últimos a la de prueba, simulando de este modo el proceso de síntesis-evaluación típico de una campaña de Química Medicinal. Este método tiene el inconveniente de depender de la disponibilidad de la fecha de evaluación del compuesto.^[137]

El número de compuestos de cada clase debe ser el similar en las distintas series.^[133] No obstante, muchas bases de datos están desbalanceadas, con un predominio de la clase inactiva; lo cual es casi siempre el caso de los resultados de estudios a gran escala empleando HTS.

El número de compuestos de cada clase no debe ser excesivamente grande por razones de tiempo de cómputo ni tampoco muy pequeño por el peligro de sobreajuste de los modelos y el consecuentemente bajo poder predictivo, así como por las limitaciones en el dominio de aplicación. Para los problemas de clasificación se propone un número óptimo entre 150-300 compuestos.^[133]

D4.1.4. Cálculo de descriptores

El análisis de la información estructural química se logra mediante el uso de descriptores moleculares. Estos son valores numéricos que caracterizan propiedades de las moléculas; por ejemplo, pueden representar las propiedades físico-químicas de la molécula o pueden ser valores derivados de la aplicación de técnicas algorítmicas a las estructuras moleculares.^[138]

Se han propuesto muchos descriptores moleculares derivados de diversas teorías para predecir las propiedades físico-químicas y biológicas de las moléculas.^[139] La información codificada por un descriptor depende del tipo de representación molecular y del algoritmo empleado para su cálculo. Hay descriptores moleculares más simples calculados mediante el conteo de algunos tipos de átomos o fragmentos estructurales en la molécula (descriptores 1D o unidimensionales). En cambio, otros se derivan de algoritmos aplicados a representaciones topológicas (grafos moleculares) y se denominan descriptores topológicos o 2D. Asimismo, hay descriptores derivados de la representación geométrica (espacial) que se denominan geométricos o descriptores 3D.^[111, 140]

Los descriptores se diferencian por la información que codifican y por el tiempo que se requiere para calcularlos. En general, los requerimientos computacionales aumentan con el nivel de discriminación que se logra. Por ejemplo, el peso molecular no dice mucho sobre las propiedades de una molécula, pero se calcula muy rápidamente. Por el contrario, los descriptores basados en mecánica cuántica pueden dar representaciones exactas de las propiedades; en cambio, requieren mucho más tiempo de cómputo.^[140]

Algunos descriptores tienen una contraparte experimental (por ejemplo el coeficiente de partición octanol-agua), mientras que otros son puras construcciones algorítmicas (por ejemplo los *fingerprints* 2D) cuya información química subyacente es menos evidente. Los descriptores moleculares deben contener, en diverso grado, información química y deben derivarse de procedimientos bien establecidos que permitan calcularlos para

cualquier grupo de moléculas. Sin embargo, hay moléculas que son rechazadas por los programas o para las cuales algunos descriptores son calculados erróneamente, entre ellas los compuestos inorgánicos, organometálicos, las moléculas cargadas, entre otras.^[140]

Se ha comprobado que el poder predictivo de los modelos QSAR depende más del tipo de descriptor químico que de la naturaleza de las técnicas de optimización del modelo.^[141, 142] Existen numerosos programas para el cálculo de descriptores entre los que se destacan ISIDA-Fragmentor, MOE, DRAGON, TOMOCOMD-CARDD, PaDEL-descriptor, HiTQSAR, QUBILs-MAS, entre otros.

El programa DRAGON en su versión 6 calcula 29 bloques o familias de descriptores moleculares.^[139, 143] De ellos, 3763 se agrupan entre los descriptores 0-2D, o sea, no se requiere conocer la estructura tridimensional de la molécula para calcularlos.

La correlación entre los descriptores también debe inspeccionarse como rutina. Aun cuando codifican propiedades esencialmente diferentes de la molécula, muchos descriptores suelen estar correlacionados. Si se combinan descriptores correlacionados la información que estos caracterizan estará sobre-representada en el modelo. La eliminación de descriptores correlacionados constituye además un procedimiento racional y eficiente de reducción de dimensionalidad.^[138]

D4.1.5. Eliminación de compuestos extremos y precipicios de actividad

Hay dos tipos de compuestos extremos (*outliers*) de los cuales preocuparse: los estructurales y los de actividad. Los primeros pueden reconocerse como singletons luego de un análisis de conglomerados por cualquiera de las técnicas estadísticas disponibles para ello. En cambio, los de actividad son más difíciles de reconocer y representan pares o grupos de compuestos en los que pequeños cambios estructurales traen aparejados cambios bruscos en las propiedades. Estos últimos se conocen como precipicios de actividad o *activity cliff*.^[144] Debe recordarse que ambos tipos de compuestos extremos pueden ser reales o debidos a errores en la representación estructural o en la anotación de la actividad biológica. En cualquier caso, la

permanencia de compuestos extremos en la base de datos afecta la estabilidad de los modelos.^[133]

La presencia de precipicios de actividad en la base de datos viola el supuesto fundamental de los estudios QSAR: compuestos similares tienen propiedades o actividades biológicas similares.^[145] Se han desarrollado varios métodos para la identificación de precipicios de actividad y se han establecido valores de corte para determinar si dos o más compuestos son suficientemente similares desde el punto de vista estructural y diferentes en términos de actividad.

Aparentemente, el grado de similitud entre los compuestos y, por ende la frecuencia de precipicios de actividad en una base de datos, varía según la métrica empleada para expresar las distancias y los descriptores empleados para representar las estructuras.^[146] Se ha propuesto que dos compuestos son similares si el coeficiente de Tanimoto es superior a 0.85 basado en la comparación de los *fingerprints* clásicos MACCS (del inglés *molecular access system structural keys*). Sin embargo, se ha comprobado que si se usan los *fingerprints* más recientes del tipo ECFP4 (del inglés *extended connectivity fingerprint with bond diameter 4*),^[147] el valor de corte equivalente es de 0.56.^[148]

También se ha considerado el término de “pareja molecular” que está formada por dos compuestos estructuralmente relacionados que difieren solo por un pequeño cambio estructural en un sitio único y están relacionados con el intercambio de una subestructura. La frecuencia de precipicios de actividad encontrados siguiendo esta definición es algo menor que empleando los dos procedimientos anteriores.^[148] Probablemente, porque el coeficiente de Tanimoto puede revelar compuestos similares, aunque tengan cambios en más de un sitio de la molécula.

Sobre las diferencias de actividad se ha propuesto que un compuesto sea al menos 10 a 100 veces más potente que el otro y como medida de actividad se proponen los valores de pK_i .^[144] Sin embargo, cuando la naturaleza de la variable respuesta es dicotómica (activo/inactivo), la relevancia de estas recomendaciones debe valorarse con discreción.

Recientemente se ha propuesto un índice que caracteriza la posibilidad de desarrollar modelos apropiados a partir de una base de datos dada. Este se conoce como índice de modelabilidad (MODI) y ha sido desarrollado para variables respuesta de tipo binario.^[149]

Para estimar este índice se calcula una matriz de distancia entre todos los compuestos de la base de datos y luego se determina para cada compuesto si el elemento más próximo pertenece a la misma clase. El MODI es la proporción de compuestos cuyo vecino más cercano pertenece a su misma clase; mientras mayor es el MODI, más modelable es la base de datos. Valores de MODI superiores a 0.65 se han correspondido con bases de datos modelables, y viceversa. Si bien el MODI no se basa exactamente en la identificación de precipicios de actividad, sí revela el comportamiento general del supuesto de relación estructura-actividad en la base de datos.^[149]

D4.1.6. Desarrollo de modelos

La primera meta de un estudio QSAR es optimizar un algoritmo matemático (modelo QSAR) que relacione los descriptores moleculares de compuestos conocidos (variables independientes) con su actividad (variable dependiente o respuesta), para luego predecir el comportamiento de otros compuestos de actividad desconocida.

Los modelos QSAR son una aproximación matemática a las relaciones subyacentes entre la estructura química de los compuestos y su actividad. Es obvio que un pequeño grupo de descriptores no puede representar íntegramente la complejidad molecular o modelar todas las respuestas e interacciones biológicas. Que los modelos sean aproximados, no significa que no sean útiles.^[140] Un modelo matemático no es ni una hipótesis ni una teoría. A diferencia de la hipótesis, el modelo no es verificable directamente por un experimento. La validación de un modelo no consiste en que sea “verdadero” sino en que genere hipótesis verificables, relevantes para problemas importantes.^[150]

El procedimiento estadístico empleado para llegar al modelo depende de la naturaleza de la variable respuesta. Si esta es de naturaleza continua se emplearán métodos de

Antecedentes

regresión que permiten estimar un valor de actividad. En cambio, si es discreta, se desarrollarán modelos de clasificación que ubican el compuesto problema en una u otra categoría (activo/inactivo, actividad alta/moderada/baja). Adicionalmente, dependiendo de la linealidad de las relaciones entre la variable respuesta y los descriptores moleculares se emplearán métodos de modelación lineal o no-lineal.^[102, 151]

Para los problemas de clasificación, que ocupan en el presente trabajo, existe diversidad de técnicas de modelación. Si se supone una relación lineal entre las variables, el método más empleado es el **análisis discriminante lineal**; aunque también se pueden usar alternativas no lineales que incluyen los árboles de clasificación en sus diversas variantes, las redes neuronales artificiales y los métodos de aprendizaje automático (clasificadores bayesianos, máquinas de soporte vectorial y k-vecinos más cercanos), entre otros.

El objetivo del análisis discriminante es separar las moléculas en clases. El tipo más simple es el análisis discriminante lineal, en el cual existen dos clases y dos variables y se busca la línea recta que mejor separa los datos, de modo que el máximo número de compuestos sea clasificado correctamente (**Figura 17**). Con más de dos variables, en vez de una línea recta, se obtiene un hiperplano en el espacio multidimensional de variables.^[138, 152]

El análisis discriminante lineal es caracterizado por una función discriminante, la cual es una combinación lineal de variables independientes (x_1, x_2, \dots, x_n) y sus coeficientes (c_1, c_2, \dots, c_n) de la forma: $W = c_1x_1 + c_2x_2 + \dots c_nx_n$. La línea (o superficie) que separa las clases es ortogonal a esta función. Con los descriptores correspondientes a una nueva molécula es posible calcular el valor de la función discriminante. Los valores resultantes por encima de un umbral pertenecen a una clase de actividad y caen a un lado de la superficie discriminante. Al contrario, los resultados por debajo del umbral corresponden a la otra clase.

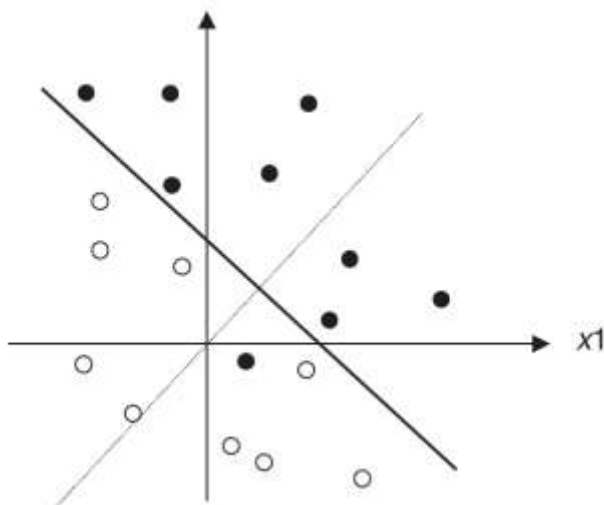


Figura 16: Representación gráfica del análisis discriminante lineal. El análisis discriminante lineal pretende obtener la línea que mejor separa las moléculas activas de las inactivas. La línea de puntos es la función discriminante y la línea sólida, la superficie discriminante correspondiente. Nótese que en este caso no es posible encontrar una línea que separe correctamente todos los casos.^[138]

El análisis discriminante lineal se usa ampliamente, en parte por la facilidad de interpretación de la relación entre los descriptores y la actividad: si los descriptores han sido previamente escalados, mientras mayor es su coeficiente en la función discriminante, mayor es la contribución a la propiedad que se modela. Sin embargo, la predicción de los valores de potencia (o la clasificación) de compuestos procedentes de bases de datos grandes y estructuralmente diversas, en las cuales las relaciones de estructura-actividad típicamente no son lineales, requieren modelos de predicción no lineales.^[151]

El método de **k-vecinos más cercanos** es un método no-lineal y ha sido de los más utilizados entre las técnicas de aprendizaje automatizado en este y otros campos. Se basa en relaciones locales de estructura-actividad y permite realizar, tanto estudios de clasificación, como de regresión. A su vez, se fundamenta en el principio general de que compuestos estructuralmente similares deben tener propiedades similares. En un espacio multidimensional de descriptores busca los k compuestos más cercanos al compuesto de interés y le asigna la actividad que predomina entre los compuestos vecinos (**Figura 18**).

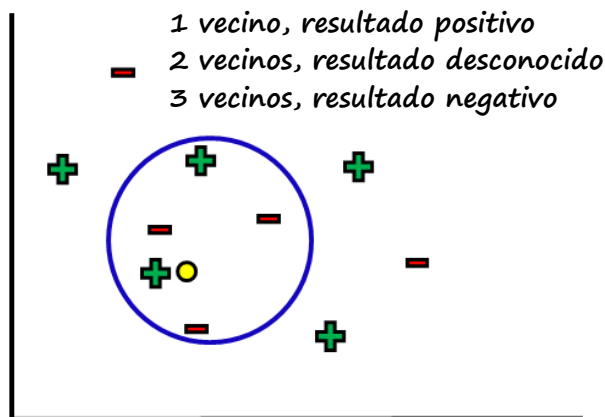


Figura 17: Representación esquemática del principio de k-vecinos más cercanos^[153]

La elección del valor de k (número de vecinos) es esencial en la construcción de un modelo de k -NN. De hecho, k puede considerarse uno de los factores más importantes del modelo en cuanto a su influencia en la calidad de las predicciones. Valores pequeños de k producen grandes variaciones en las predicciones. En cambio, valores muy altos incrementan el costo computacional y carecen de significado. El valor de k será suficientemente alto como para maximizar la exactitud y tan pequeño (con respecto al número de compuestos en la serie de entrenamiento) que el número de compuestos vecinos estén relevantemente cerca del que se va a predecir.

El valor óptimo de k se estima mediante validación cruzada empleando la serie de entrenamiento. Se elige el valor mínimo de k a partir del cual no hay un aumento significativo de la exactitud en la validación cruzada. Cuando la relación entre la variable respuesta y los descriptores es débil y cuando la serie de entrenamiento es numerosa el valor de k que optimiza la exactitud de las clasificaciones tiende a ser alto.^[154] La curva de exactitud *versus* k suele ser aplanada en la vecindad del valor óptimo de k , de modo que puede elegirse un menor valor de k sin tener un efecto adverso apreciable en la exactitud. En concordancia, se ha propuesto seleccionar el menor valor de k para el cual la exactitud no difiere de la máxima en más de un porcentaje prefijado (1 ó 5%).^[155]

Los otros factores a optimizar en un modelo de k-NN son los descriptores, la métrica de distancia y la ponderación de estas en función de su magnitud. Si bien este método es poco sensible al sobreajuste por causa del uso de un número excesivo de descriptores, mientras más descriptores se emplean mayor es la intensidad de cómputo. Asimismo, la inclusión de descriptores que no guardan relación con la variable respuesta incrementa innecesariamente el error en los valores de distancia, ocultando las verdaderas relaciones de estructura y actividad subyacentes.^[154]

Por regla general, cuando el número de descriptores es excesivo, las distancias del compuesto problema al vecino más cercano y al más lejano se hacen similares, ya que los valores de similitud se concentran alrededor de la media.^[156] De este modo, las medidas de similitud pierden el poder discriminante. Este fenómeno, conocido como “maldición de dimensionalidad”,^[156, 157] caracteriza la inestabilidad de los vecinos más cercanos (y otras muchas técnicas) en los espacios de alta dimensionalidad.^[158]

Existen varias medidas de distancia para determinar el grado de proximidad de los compuestos vecinos. Las más empleadas incluyen la distancia de Euclides, de City-block (Manhattan), Chebychev y Mahalanobis.^[153, 154] La elección entre ellas es asunto de ensayo-error usando distintos grupos de variables y valores de k.

Puede optarse por dar igual peso en la decisión a los k vecinos, independientemente de su distancia con respecto al compuesto problema. En cambio, se puede asignar mayor contribución a los vecinos que más cercanos se encuentren a él. El uso de coeficientes de ponderación en función de las distancias de los k vecinos es un procedimiento racional, muy especialmente cuando los valores de k son pares y existe igual cantidad de vecinos de una y otra clase. Este procedimiento generalmente incrementa la exactitud y la capacidad predictiva de los modelos. No obstante, el peligro de sobreajuste debe monitorearse cuidadosamente asegurando que los efectos de la ponderación en la serie de entrenamiento tengan igual repercusión en la serie de prueba.^[154]

____ Antecedentes ____

Independientemente del método estadístico de clasificación utilizado para el desarrollo de los modelos, existe un grupo de indicadores de calidad que permite seleccionar los modelos de mejor desempeño. Para su mejor entendimiento suele construirse la llamada matriz de confusión. Esta consiste en una tabla de 2x2 (**Tabla 2**) en la que las columnas representan los valores observados (reales) y las filas, los estimados:

Tabla 2: Matriz de confusión para evaluar el desempeño de los modelos de clasificación

	Positivos reales (P)	Negativos Reales (N)
Positivos estimados	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
Negativos estimados	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)

Entre los indicadores más empleados se incluyen los siguientes:^[159, 160]

Exactitud (Q): Proporción de compuestos bien clasificados con respecto al total de compuestos. $Q = (VP + VN)/(P + N) * 100$ *Ecuación 1*

Sensibilidad (Se): Proporción de compuestos activos correctamente clasificados. $Se = VP/P * 100$ *Ecuación 2*

Especificidad (Sp): Proporción de compuestos inactivos correctamente clasificados. $Sp = VN/N * 100$ *Ecuación 3*

Precisión (Pr): Proporción de compuestos clasificados como activos por el modelo que son realmente activos. $Pr = VP/(VP + FP)$ *Ecuación 4*

Tasa de falsa alarma (FAR) o tasa de falsos positivos: Se calcula como la proporción de compuestos inactivos que son mal clasificados por el modelo.

$FAR = FP/N * 100 = 100 - Sp$ *Ecuación 5*

Existen otros dos indicadores frecuentemente empleados que se calculan a partir de la matriz de confusión: el coeficiente de correlación de Matthews (C) y la medida F, también conocida como F_1 . Si bien ambas se usan ampliamente, se plantea que C es más informativo que F_1 porque este último, a diferencia del primero, no incluye los “verdaderos negativos”.

F_1 es la media armónica de la sensibilidad y la precisión. O sea,

$$\frac{1}{F_1} = \frac{\frac{1}{Se} + \frac{1}{Pr}}{2} \quad \text{Ecuación 6}$$

De ahí que $F_1 = 2 * \frac{Se * Pr}{Se + Pr}$ Ecuación 7

Y, finalmente se cumple que $F_1 = \frac{2VP}{2VP + FP + FN}$ Ecuación 8

F_1 toma valores de 0-1, correspondiendo los valores más altos al mejor desempeño de los modelos.

El coeficiente de correlación de Matthews^[161] se calcula mediante la fórmula:

$$C = \frac{VP * VN - FP * FN}{\sqrt{(VP + FP)(VP + FN)(VN + FP)(VN + FN)}} \quad \text{Ecuación 9}$$

y toma valores desde -1 hasta 1. Empíricamente, se puede comprobar una correlación lineal entre F_1 y C ($R^2=0.74$, $N=20'000$). Valores de $C>0.9$ se corresponden con valores de $F_1>0.95$ ($R^2=0.985$, $N=84$) y valores de $C>0.8$ se corresponden con valores de $F_1>0.88$ ($R^2=0.97$, $N=420$).

En el análisis discriminante lineal también se emplean la lambda de Wilks (λ) y el cuadrado de la distancia de Mahalanobis (CDM). Ambos se estiman estadísticamente. La λ de Wilks es la relación entre la varianza dentro de las clases y la varianza total en las variables discriminantes.^[162] Dicho de otro modo, λ representa la proporción de la varianza de la variable respuesta (en la serie de entrenamiento) que no es explicada por la combinación de variables independientes en el modelo. Toma valores de 0-1 y mientras más bajo es su valor, mayor es la relación entre los descriptores y la variable respuesta.

El CDM es una medida de la distancia entre los centroides de las clases, o sea, entre las medias de los valores estimados por la función discriminante para todos los integrantes de cada una de las clases.^[162] Valores altos de CDM indican una mejor discriminación entre las clases.

D4.1.7. Validación de los modelos

Demostrar correlaciones estadísticamente significativas entre variables no significa necesariamente que exista una relación de causalidad entre ellas. Igual ocurre con los modelos. Con el gran número de descriptores que se puede calcular para una molécula en la actualidad y las potentes herramientas computacionales disponibles, es posible obtener modelos matemáticos por combinaciones aleatorias de variables que no tienen relación con la propiedad que se modela. Si bien estos modelos pueden tener adecuados indicadores de desempeño en la serie de entrenamiento, su capacidad predictiva será limitada. Es por ello que es esencial la validación de los modelos.

Se han empleado diversos procedimientos para validar los modelos QSAR. En la actualidad, el criterio de validación más importante radica en el desempeño del modelo en una serie externa.^[133] Adicionalmente, se puede demostrar mediante validación cruzada y por aleatorización de la variable respuesta que existe una verdadera relación entre los descriptores moleculares y la actividad.

La validación cruzada por el método de **dejar un grupo fuera** (LGO) consiste en dividir de forma aleatoria la serie de entrenamiento en n-grupos. El tamaño de los grupos es variable y puede ser desde un solo compuesto hasta determinados porcentajes de la base de datos, digamos 5 ó 10%, aunque se ha empleado hasta el 50%.^[15] En cada corrida se excluye un grupo, se reajustan los coeficientes del modelo conservando las mismas variables y se evalúa el desempeño del “nuevo” modelo en la serie de prueba. Se repite el procedimiento dejando fuera un grupo a la vez hasta tanto se hayan dejado todos fuera en una ocasión. Se calcula entonces los valores medios, mínimos y máximos de la exactitud (y otros indicadores de desempeño) de los modelos en la serie de prueba. Como resultado, un buen modelo no debe mostrar una afectación

importante de su desempeño por la exclusión de grupos de compuestos en la serie de entrenamiento.^[163]

La **aleatorización de la variable respuesta** consiste en asignar valores aleatorios a la actividad de los compuestos en la serie de entrenamiento. Con las mismas variables se obtiene el mejor modelo y se evalúa su desempeño en la serie de prueba. Si realmente existía una relación entre los descriptores y la actividad, el modelo debe arruinarse y mostrar indicadores de desempeño no mucho mejores que una clasificación al azar, o sea, próximos al 50% de clasificación correcta.^[111]

D4.1.8. Fusión de modelos

Para una misma base de datos se pueden desarrollar múltiples modelos (óptimos en su tipo), al emplear distintos descriptores y técnicas de modelación. ¿Cuál usar entonces para predecir la actividad de los nuevos compuestos de interés? En lugar de usar el (supuestamente) mejor modelo, según su desempeño durante la fase de desarrollo y validación, se ha preferido combinar grupos de modelos para aumentar la precisión y el dominio de aplicación. Algunos prefieren fusionar todos los modelos con indicadores adecuados de exactitud (lo cual maximiza el dominio de aplicación), mientras que otros prefieren ensamblar un número mínimo de los modelos más diversos (mayor economía computacional).

Un enfoque, aparentemente similar al anterior, se refiere a las dos vertientes en cuanto al manejo de la serie de entrenamiento en el desarrollo de multclasificadores. En la primera, conocida como **fusión**, se entrenan todos los modelos con la misma base de datos. En la segunda, conocida como **selección**, se entrenan los modelos con distintos fragmentos de la base de datos, de modo que se obtienen clasificadores expertos en distintos conjuntos de datos. Esta última ha sido menos explotada, a pesar de que probablemente funcione mejor si se entrena adecuadamente.^[164]

De cualquier manera, la idea en los sistemas de ensamble o fusión es crear muchos modelos y combinar sus resultados, de modo que la combinación supere el desempeño de los clasificadores independientes. Esto requiere que los modelos individuales se

“equivocuen” en casos diferentes, o sea, sean diversos. Para mejorar la diversidad de los modelos en un ensamble se pueden entrenar los clasificadores con distintos tipos/grupos de descriptores^[165] o usar distintas técnicas estadísticas de modelación.

Para la selección de modelos diversos se han empleado varias medidas. Entre las más empleadas se incluyen las medidas pareadas de desacuerdo, doble fallo, la correlación mínima y la Q de Yule. En cambio, existen indicadores de diversidad, no para dos modelos en particular, sino para el conjunto de modelos del ensamble final. Estas incluyen la entropía E, la varianza de Kohavi–Wolpert, el acuerdo inter-clasificadores k , la medida θ de dificultad, la diversidad generalizada y la diversidad de fallo coincidente.^[164, 165] No hay medida de diversidad que se correlacione consistentemente con una mayor exactitud. En ausencia de información adicional se ha sugerido el uso de la Q de Yule debido a su significado intuitivo y su fácil implementación.^[166]

La combinación de los modelos se lleva a cabo siguiendo diferentes reglas, siendo las más comunes el voto mayoritario, el voto ponderado, la media de las probabilidades, la mediana, el producto, el mínimo, el máximo y la mediana. Las variantes de voto tienen el inconveniente de que los compuestos no pueden ordenarse y con ello se dificulta establecer prioridades en la gestión y evaluación de los productos. A pesar de ello, ha sido probablemente el método más utilizado.^[164-166]

D4.1.9. Predicción

La predicción de la actividad de nuevos compuestos cuya actividad es desconocida es el objetivo primordial de un modelo QSAR. No obstante, el escenario de búsqueda en el que se pretende aplicar el modelo debe tenerse en cuenta desde el mismo principio de su desarrollo. Los criterios de calidad para seleccionar los mejores modelos dependen en gran medida del escenario donde estos se van a aplicar finalmente.

Según la magnitud de las bases de datos que se evaluarán con los modelos serán más importantes unos u otros indicadores de desempeño. Por ejemplo, si se pretende cribar una base de datos como ZINC, ChemSpider o PubChem Compound que cuentan con 20-30 millones de compuestos cada una, deberán desarrollarse preferiblemente

modelos a partir de descriptores y por procedimientos estadísticos con baja demanda de cómputo, con un índice de especificidad/sensibilidad alto, una FAR sustancialmente baja y una alta precisión. En cambio, si el modelo está destinado al cribado de pequeñas bases de datos, digamos unos pocos miles de compuestos, (FDA, Tocriscreen, Malaria BOX, Selleck) entonces se admiten descriptores y técnicas de modelación más complejas, así como modelos de menos especificidad y precisión, pero con más alta sensibilidad, que permitan identificar los pocos compuestos con potencialidades en la base de datos.

D4.1.9.1. Teorema de Bayes

El valor de probabilidad que se obtiene al evaluar un compuesto de actividad desconocida mediante un modelo de clasificación no puede tomarse directamente como su probabilidad de ser realmente activo. Este error puede encontrarse en trabajos publicados, incluso en el tema que nos ocupa.^[167] Dicha probabilidad depende además de cuán exacto sea el modelo (sensibilidad-especificidad) y de la proporción de compuestos activos en la base de datos a investigar. Los fundamentos teóricos publicados para la solución de este problema datan del Siglo XVIII con el enunciado de su teorema por el Reverendo Thomas Bayes.^[168-170]

El Teorema de Bayes se utiliza para revisar probabilidades previamente calculadas cuando se posee nueva información sobre la ocurrencia de los sucesos. Comúnmente, se inicia un análisis de probabilidades con una asignación inicial, probabilidad *a priori*. Cuando se tiene nueva información sobre los sucesos se calculan las probabilidades revisadas o *a posteriori*. El teorema de Bayes permite calcular las probabilidades *a posteriori* y puede representarse por la siguiente ecuación:

$$p(A_i/B) = \frac{p(A_i)p(B/A_i)}{\sum_{i=1}^n p(B/A_i)} \quad \text{Ecuación 10}$$

Siendo $p(A_i/B)$ la probabilidad condicional de que el suceso A_i ocurra, dado que ocurrió el suceso B ; $p(A_i)$, la probabilidad de ocurrencia del suceso A_i y $p(B/A_i)$, la probabilidad de ocurrencia del suceso B dado que ocurrió A_i .

____ Antecedentes ____

La adaptación de esta fórmula a un problema de clasificación binario (activo/inactivo) pudiera representarse como:

$$p(A/A_t) = \frac{p(A)p(A_t/A)}{p(A)p(A_t/A)+p(I)p(A_t/I)} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde $p(A/A_t)$ es la probabilidad de que un compuesto que haya sido clasificado teóricamente como activo realmente lo sea; $p(A)$ y $p(I)$, la proporción de compuestos activos e inactivos en la base de datos a tamizar; $p(A_t/A)$, la probabilidad de que un compuesto activo sea clasificado teóricamente como activo y $p(A_t/I)$, la probabilidad de que un compuesto inactivo sea clasificado como activo.

Teniendo en cuenta que $p(A_t/A)$ es igual a la sensibilidad (Se) y $p(A_t/I)$ a la tasa de falsos positivos, o sea, 1-especificidad (Sp); las probabilidades (posteriores) de que los compuestos clasificados como activos realmente lo sean, se calcula mediante la fórmula:

$$p(A/A_t) = \frac{p(A)Se}{p(A)Se+p(I)(1-Sp)} \quad \text{Ecuación 12}$$

$$\text{O lo que es igual, } p(A/A_t) = \frac{p(A)Se}{p(A)Se+[1-p(A)](1-Sp)} \quad \text{Ecuación 13}$$

Por lo tanto, la probabilidad de que el compuesto clasificado por el modelo como activo también lo sea experimentalmente, depende de la sensibilidad y especificidad del modelo y de la proporción de compuestos activos en la base de datos a evaluar. Mientras mayores sean estas tres variables, mayor es la probabilidad posterior. También puede deducirse que, independientemente del valor de las otras dos variables, una especificidad del 100% ($Sp=1$) se relaciona con una probabilidad posterior igual a 1.

Finalmente, debe notarse que la sensibilidad y especificidad del modelo pueden variarse, a conveniencia según el contexto, cambiando el valor de probabilidad que se toma como frontera para diferenciar los compuestos activos de los inactivos.^[171, 172]

D4.1.9.2. Dominio de aplicación

Además de los distintos indicadores de calidad y robustez de los modelos que validan su uso como instrumentos de predicción, debe tenerse en cuenta el dominio de aplicación.^[104, 133, 142, 173, 174] Análogo al riesgo de extrapolación en la regresión lineal ocurre con la predicción de la actividad de compuestos que están fuera del dominio de aplicación de los modelos. Esto no implica que no pueda hacerse la predicción de un determinado compuesto. De hecho, casi siempre puede hacerse, con la excepción de cuando algún descriptor no se puede calcular. Se trata de que la predicción realizada sea válida.

El dominio de aplicación en el ambiente QSAR expresa el alcance y limitaciones de un modelo, o sea, el rango de estructuras químicas para el cual el modelo es aplicable. Existe un balance entre el poder predictivo de un modelo y su dominio de aplicación. En general, los modelos desarrollados a partir de bases de datos diversas (amplio dominio de aplicación) no tienen buenos indicadores de exactitud y poder predictivo. Por el contrario, los modelos para clases específicas de compuestos (dominio de aplicación estrecho) tienden a ser más predictivos.^[175]

Para evaluar la conformidad con el dominio de aplicación se toma como base el espacio químico ocupado por la serie de entrenamiento. Este puede ser visto desde la perspectiva del espacio de descriptores del modelo o mediante análisis de similitud estructural.^[176]

Uno de los métodos más utilizados prueba si los valores de todos los descriptores calculados para el compuesto en cuestión se encuentran en el **rango** (mínimo-máximo) de dichos descriptores para los compuestos de la serie de entrenamiento. Mientras más descriptores tiene el modelo, mayor es la probabilidad de que un compuesto quede fuera del dominio de aplicación. Además, para un determinado descriptor pueden existir intervalos despoblados de compuestos (entre el valor mínimo y el máximo) en el cual las predicciones son también inciertas. Este método tampoco tiene en cuenta la existencia de correlaciones entre los descriptores. Como alternativa a este último

inconveniente se ha desarrollado una variante en que se exploran los rangos luego de un análisis de componentes principales.^[177]

Otros métodos se refieren a la **distancia** (de Euclides, Manhattan o Mahalanobis) del compuesto con respecto al centroide de la serie de entrenamiento en el espacio multidimensional de los descriptores del modelo. También puede ser la distancia promedio o máxima entre el compuesto y cada uno de elementos de la serie de entrenamiento. La inclusión o no en el dominio de aplicación depende de si la distancia calculada es inferior a valores de corte previamente seleccionados. Al igual que los métodos de rangos, los de distancia son incapaces de reconocer áreas internas despobladas de compuestos en la serie de entrenamiento.^[176]

Un tercer grupo de métodos para estimar las regiones de interpolación se basan en las **distribuciones de las funciones de probabilidades**. Los métodos paramétricos emplean las funciones de densidad de probabilidad habituales como la normal y la de Poisson. En cambio, los métodos no-paramétricos permiten la estimación de densidad de probabilidad directamente a partir de los datos. No existen supuestos para ello y es el único procedimiento que permite identificar regiones internas despobladas. Además, si estas se encuentran próximas a la superficie convexa que limita el dominio de aplicación, los métodos no paramétricos pueden generar regiones cóncavas para reflejar la distribución real de los datos. Finalmente, para cada compuesto se calcula la probabilidad de pertenecer al conjunto de datos que generó el modelo.^[176]

Además de estimar si un compuesto se encuentra en el dominio de aplicación de un modelo mediante diversos métodos, algunos programas informan el consenso de los métodos empleados usando un sistema de voto mayoritario.^[178, 179]

Razonablemente, se ha propuesto que la variable respuesta debe también considerarse a la hora de estudiar el dominio de aplicación de los modelos.^[176] Sin embargo, en el marco de los modelos de clasificación binaria, esto carece de relevancia.

D5. Diseño racional de fármacos aplicado a la búsqueda de medicamentos para la leishmaniosis y la tripanosomiasis americana

Una búsqueda en PubMed, actualizada el 15 de febrero de 2016, con los términos drug, QSAR, “in silico”, *Leishmania* y “*Trypanosoma cruzi*”, de forma independiente evidenció que se ha investigado extensamente en estos campos (**Tabla 3**). Por el contrario, las cifras también reflejan que ha sido limitada la aplicación de los métodos QSAR al estudio de estos parásitos y en particular a la búsqueda de medicamentos.

Luego de un estudio más detallado pudo comprobarse que: 1) una fracción incluso menor de artículos se refiere a la aplicación de métodos QSAR para la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente activos; 2) la inmensa mayoría describe el desarrollo de modelos de tipo local, o sea, relacionados con la modelación de familias específicas de compuestos; 3) las técnicas de *docking* han sido las empleadas primordialmente; y 4) si bien los métodos QSAR han sido relativamente poco usados en este campo, ha habido un auge en los últimos años, reflejado en que el 63% de los artículos fueron publicados a partir del 2010, 31% en el período 2000-2009 y solo el 6% en el pasado siglo.

Aun cuando existen referencias del cribado *in vitro* de grandes colecciones de compuestos^[180-183] tanto para *Leishmania* como para *T. cruzi*, el uso de métodos QSAR para el filtrado previo de bases de datos extensas es limitado.^[15, 184, 185]

En el caso de *Leishmania* se han desarrollado modelos QSAR (de tipo local) para inhibidores de diversas enzimas, incluyendo entre las más estudiadas la tripanotion-reductasa,^[186-188] la pteridin-reductasa-1,^[189-192] la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa^[193, 194] y la dihidrofolato-reductasa, entre otras.^[195, 196] Con estos modelos se han identificado rasgos estructurales estrechamente relacionados con la actividad inhibitoria sobre dichas enzimas, pero aplicables solo a grupos específicos de compuestos.

Tabla 3: Publicaciones indizadas en PubMed relacionadas con métodos QSAR, *Leishmania*, *T. cruzi* y medicamentos.

Términos de búsqueda	PubMed
drug	4 788 488
QSAR	13 876
“in silico”	23 302
Leishmania	21 721
“Trypanosoma cruzi”	13 040
QSAR Leishmania	61
“in silico” Leishmania	131
Leishmania (“in silico” OR QSAR)	187
Leishmania (“in silico” OR QSAR) drug	116
QSAR “Trypanosoma cruzi”	44
“in silico” “Trypanosoma cruzi”	76
“Trypanosoma cruzi” (“in silico” OR QSAR)	115
“Trypanosoma cruzi” (“in silico” OR QSAR) drug	73

Los métodos QSAR para la identificación de compuestos potencialmente activos contra *T. cruzi*, si bien han sido aparentemente menos empleados que en la búsqueda de anti-leishmaniales, varios artículos desarrollan modelos globales de clasificación de la actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* del parásito. No obstante, presentan los inconvenientes de que 1) las bases de datos han sido relativamente pequeñas y 2) generalmente los productos se han evaluado frente a epimastigotes, los cuales no se consideran el estadio relevante para estos ensayos. Las dianas enzimáticas más exploradas han sido la cruzipaina/cruzaína,^[197-199] la tripanotio-reductasa^[200-202] y la dihidrofolato reductasa,^[203] no obstante, en la mayoría de los estudios se ha modelado la actividad frente a los parásitos en cultivo.

Para *T. cruzi* se han logrado modelos de regresión y de clasificación con buenos indicadores de desempeño y adecuado poder predictivo (a juzgar por la efectividad en la identificación de compuestos experimentalmente activos). Se han descrito modelos

de clasificación con exactitudes cercanas o superiores al 90% en las series de entrenamiento y de prueba.^[204-207] Sin embargo, no hemos encontrado ningún artículo en que se haya empleado una serie externa, según recomendaciones de expertos en este tema,^[133] para evaluar la predictividad de los modelos de clasificación.

E. MATERIALES Y MÉTODOS

E1. Desarrollo de modelos computacionales para predecir la actividad de medicamentos contra *L. major* y *T. cruzi*.

E1.1. Modelos para predecir actividad inhibitoria frente a promastigotes de *L. major*.

E1.1.1. Base de Datos, curado, selección de compuestos y formación de las series externa y de modelación (entrenamiento y predicción interna)

Se empleó una base de datos constituida por 196'144 compuestos probados frente a promastigotes de *Leishmania major* a 10 μ M. Los 17'620 compuestos que produjeron una inhibición del crecimiento superior al 50% en comparación a los cultivos controles fueron clasificados como activos.^[183]

Curado de la base de datos: A los efectos del presente trabajo se consideraron activos los 7'455 compuestos que provocaron una inhibición de crecimiento superior al 90%. Igualmente, se eligieron como inactivos a los 120'596 que no mostraron ningún efecto sobre el crecimiento de los promastigotes (inhibición del crecimiento igual a cero).

El curado estructural de la base de datos consistió en la eliminación de duplicados, de sales y mezclas, de compuestos organometálicos, hidrógenos explícitos, isótopos, definiciones de grupos R y la información 3D. Adicionalmente, se normalizó la representación de los anillos aromáticos (forma de dobles enlaces alternos) y los grupos nitro ([O-][N+]=O). Para ello se empleó el módulo "Standardizer" implementado en el programa ChemAxon.^[208]

Selección de compuestos activos: Usando la función "ALEATORIO()" de Microsoft Excel se generó un número aleatorio por cada uno de los 6'224 compuestos activos remanentes luego del curado. Posteriormente se ordenó la data de compuestos siguiendo el orden de los números aleatorios y se escogieron los primeros 300 compuestos para formar la serie externa.

A los 5'924 compuestos restantes se les calcularon las cadenas de conteo de subestructuras (*SubstructureFingerprintCount*) implementadas en el programa PaDEL-Descriptor Versión 2.1.7^[209, 210] que codifica la presencia de 307 subestructuras. Se escogieron las 35 variables correspondientes a las subestructuras cuyos valores no fueron iguales para más del 90% de los compuestos. Las variables fueron escaladas al intervalo 0-1 mediante la transformación: $x_t = \frac{x-MIN}{MAX-MIN}$ (Ecuación 14)

Donde x_t es el valor transformado de x ; mientras que MIN y MAX son los valores mínimos y máximos que toma x , respectivamente. Con estas variables se realizó un análisis de conglomerados empleando el paquete estadístico STATISTICA versión 8.0.^[153] Se formaron 20 conglomerados por el método de “k-medias”. Para elegir los centroides de los conglomerados se escogieron las observaciones que maximizaran las distancias iniciales entre los mismos. De cada conglomerado se escogieron aleatoriamente 35 compuestos para la serie de entrenamiento (700 en total) y 15 para la de predicción interna (300 en total).

Selección de compuestos inactivos: Luego del curado inicial de la base de datos quedaron 117'072 moléculas inactivas. Estas fueron separadas aleatoriamente en seis bloques de 19'512 compuestos para facilitar su procesamiento. Se calcularon las cadenas de conteo de subestructuras, seleccionándose de 32-36 descriptores para el análisis de conglomerados de los distintos bloques. Estos fueron fraccionados en 20 conglomerados, seleccionándose aleatoriamente 50 compuestos por conglomerado, de modo que se eligieron 1000 compuestos por cada bloque. De esta manera se logra una reducción del conjunto de moléculas inactivas curadas a solo 6000 compuestos. De estos se seleccionaron aleatoriamente 300 para la serie externa de compuestos inactivos. El resto se sometió a una nueva partición en 20 conglomerados para elegir aleatoriamente de cada uno 35 compuestos para la serie de entrenamiento (700 en total) y 15 para la serie de predicción interna (300 en total).

Identificación de precipicios de actividad: Una vez selectas las 1000 moléculas activas y las 1000 inactivas de las series de modelación (entrenamiento y predicción interna) se procedió a explorar la existencia de precipicios de actividad (*Activity Cliff*). Para ello se

____ *Materiales y Métodos* ____

calculó la matriz de similitud entre los compuestos activos y los inactivos de las series de modelación. Como índice de similitud se empleó el coeficiente de Tanimoto basado en cadenas de farmacóforos (*Pharmacophore fingerprints*) implementado en el complemento JChem para Excel de ChemAxon.^[211] Se consideraron precipicios de actividad aquellos pares de compuestos con diferente actividad y un coeficiente de similitud superior a 0.7. Estos fueron eliminados de la base de datos, y se eligieron los 700 compuestos (activos e inactivos) de la serie de entrenamiento y los 300 de la serie de predicción interna. Finalmente, la base de datos depurada y balanceada quedó del modo siguiente:

	Entrenamiento	Predicción Interna	Predicción externa
Activos	350	150	300
Inactivos	350	150	300

E1.1.2. Cálculo de descriptores moleculares

Se calcularon los 3'763 descriptores 0-2D implementados en el programa DRAGON Versión 6.0.^[140] De estos se eliminaron aquellos con valores constantes (1191) y casi constantes (88), los altamente correlacionados (coeficiente de correlación superior a 0.95 – 1143 descriptores) y los que no pudieron ser calculados (21) para alguna molécula. Los 1320 descriptores restantes fueron agrupados según las familias concebidas en el propio programa DRAGON, a saber: índices constitucionales, descriptores de anillos, índices topológicos, conteos de caminos y rutas (*walk and path counts*), índices de conectividad, índices de información, descriptores basados en la matriz 2D, autocorrelaciones 2D, *Burden eigenvalues*, descriptores tipo P_VSA, índices ETA, índices de adyacencia de bordes, conteo de grupos funcionales, fragmentos centrados en átomos, índices *E-state* tipo átomo, CATS-2D, pares de átomos 2D, propiedades moleculares e índices de similitud a medicamentos.

E1.1.3. Desarrollo de modelos

Como técnica de modelación se empleó el análisis discriminante lineal implementado en STATISTICA. Para cada familia de descriptores se hicieron bloques de 25-30 variables, con las que se construyeron modelos preliminares de hasta 10 variables. Con las variables incluidas en los modelos preliminares se optimizaron los modelos por familias. Para elegir la cantidad máxima de variables en el modelo (dimensión óptima) se consideró que el modelo alcanzara una tasa de falsos positivos mínima en la serie de predicción interna y que la exactitud lograda en la serie de entrenamiento no estuviera acompañada de una disminución de la exactitud en la serie de predicción interna. Como indicadores de la calidad de los modelos se determinó la exactitud, la sensibilidad, la precisión, la medida F_1 , la lambda de Wilks y el cuadrado de la distancia de Mahalanobis. Con las variables incluidas en los modelos por familias se construyeron modelos generales. Primeramente se determinó la dimensión óptima de estos modelos para luego elegir los mejores y más diversos con este número de variables.

E1.1.4. Ensamble de modelos

Las probabilidades generadas para cada compuesto por los modelos obtenidos por familias y otros 10 modelos generales fueron fusionadas con el objetivo de incrementar la calidad en las predicciones y/o aumentar el dominio de aplicación del multclasificador que se emplearía para la predicción final. Para ello se empleó el programa DASDE,^[212] con el cual se hizo una selección previa de los modelos más diversos según las siguientes medidas: desacuerdo, doble fallo, diferencia, correlación y Q-estadística. Posteriormente, estos modelos fueron fusionados por los métodos de mediana, media, máximo y producto de las probabilidades.

Se eligió el ensamble de modelos con el balance más adecuado de exactitud, medida F_1 , tasa de falsos positivos y precisión. Se consideró además la cantidad de compuestos incluidos en sus dominios de aplicación. Para ello se tomó como escenario de evaluación una base de datos de 9'284 estructuras de medicamentos en uso con otras indicaciones según se describe en el acápite E1.1.6, 3'106 compuestos de Selleckchem^[213] y 10'747 incluidos en la base de datos interna del programa AMBIT.^[179]

E1.1.5. Robustez de los modelos

Una vez seleccionado el sistema de clasificación se evaluó su robustez. Para ello se realizó la validación cruzada mediante el método de dejar un grupo de compuestos fuera (LGO, siglas derivadas de “*leave group out*”) y por aleatorización de la variable respuesta.

Para la validación cruzada se hicieron aleatoriamente diez particiones de la serie de entrenamiento y se corrieron nuevamente los modelos excluyendo en cada corrida un grupo de compuestos. Se determinó en cada una de las corridas la exactitud de la clasificación en la serie externa, se calculó la exactitud promedio de las diez corridas y los valores extremos (mínimo y máximo). El otro método consistió en aleatorizar la variable respuesta (actividad observada), correr nuevamente el modelo y evaluar la exactitud en la serie de prueba tal y como se describió anteriormente.

E1.1.6. Predicción de la actividad anti-*L. major*

Como fuente para la búsqueda de nuevos compuestos potencialmente activos se emplearon bases de datos de fármacos licenciados, a saber:

- Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba (424 compuestos)^[214]
- Listado de Medicamentos Genéricos (6'296 compuestos)^[215]
- Fármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los EE.UU. (1'216 compuestos)^[216, 217]
- Base de datos DrugBank (1'348 compuestos)^[218]

Se realizó el curado de estas bases de datos siguiendo los mismos procedimientos descritos anteriormente para los compuestos empleados en el desarrollo de los modelos. Posteriormente, con el programa DRAGON, se calcularon los descriptores incluidos en los modelos del ensamble. Estos fueron corridos usando la serie de entrenamiento para entonces calcular la probabilidad de los compuestos en

investigación de ser activos. Luego, se ensamblaron en el multclasificador según el criterio de fusión previamente escogido y se obtuvo una predicción de la actividad.

Para identificar los compuestos incluidos en los dominios de aplicación de los modelos se empleó el programa “AMBIT *Discovery*”,^[179] determinándose los dominios de aplicación en base a los rangos, la distancia de Euclides respecto a la media, la distancia de Manhattan, la densidad de probabilidad y, finalmente, el consenso de los distintos métodos. Este último fue el que se tomó como criterio para considerar válida o no la inclusión de cada compuesto en el dominio de aplicación de cada uno de los modelos.

Para la fusión de los resultados en el multclasificador se consideraron solo las probabilidades estimadas por los modelos en cuyo dominio de aplicación estuvo incluido el compuesto. Se desecharon los compuestos que no quedaron enmarcados en el dominio de aplicación de ninguno de los modelos individuales. Basado en el resultado de la fusión se realizó un ordenamiento para establecer la prioridad en la gestión de ingredientes farmacéuticos activos para las evaluaciones *in vitro*. Se consideraron además las propiedades farmacológicas y toxicológicas, así como la disponibilidad de los compuestos para hacer la selección final.

E1.2. Desarrollo de modelos para predecir actividad contra amastigotes de *T. cruzi*

E1.2.1. Base de datos, curado, selección de compuestos y formación de las series externa y de modelación (entrenamiento y predicción interna)

De modo general se siguió la misma metodología que la descrita anteriormente para los modelos anti-leishmaniales. Se empleó una base de datos constituida por 303'286 compuestos probados a 6 μ M frente a amastigotes de *T. cruzi* mediante un sistema robotizado.^[181] Los 4'394 compuestos que produjeron una inhibición del crecimiento superior al 50% con respecto al control no tratado fueron considerados activos. De ellos fueron probados 4'063 en un ensayo confirmatorio,^[219] resultando activos ($CI_{50} < 6\mu M$) 4'014. Luego de la eliminación de sales, mezclas y compuestos repetidos se

_____ *Materiales y Métodos* _____

seleccionaron los 1'312 compuestos con una CI_{50} inferior a 1 μM . Estos se tomaron como fuente para la conformación de las series de compuestos activos. El 20% (260 compuestos) se seleccionó aleatoriamente para la serie externa y el resto se comparó con una preselección de inactivos (según se describe a continuación) para la búsqueda de precipicios de actividad y la posterior conformación de las series de entrenamiento y prueba.

Para seleccionar los compuestos inactivos se eliminaron los repetidos (108), los activos a 6 μM (4'394), los compuestos con resultados inconclusos (929), las sales, las mezclas (11'180); y los que producían una inhibición del crecimiento promedio superior al 15% (33'814), superior al 25% en alguna de las réplicas (1'689) o un incremento en el crecimiento superior al 50% (posibles estimuladores del crecimiento - 430). Los compuestos restantes (250'740) fueron divididos en bloques de 50'000 aproximadamente para facilitar los cálculos y el procesamiento de la información. Se calcularon los índices constitucionales y las propiedades moleculares, eliminándose los descriptores altamente correlacionados ($r > 0.9$), constantes y casi constantes.^[220] Con los descriptores seleccionados se realizan análisis de conglomerados para formar 20 conglomerados por bloque y seleccionar aleatoriamente 19 compuestos por conglomerado. De este modo se eligieron al azar 380 compuestos por bloque para un total de 1'900 compuestos inactivos. De estos se extrajeron aleatoriamente los 260 compuestos para la serie externa de inactivos.

Con los 1'640 restantes y los 1'052 compuestos activos se realizó una búsqueda de pares de compuestos formadores de precipicios de actividad tal y como se describió para los anti-leishmaniales. Los compuestos identificados fueron descartados y con los restantes (842 activos y 1'221 inactivos) se realizaron análisis de conglomerados (por separados los activos y los inactivos) y se seleccionaron 350 compuestos para la serie de entrenamiento y 150 para la de prueba, tanto de los activos como de los inactivos. Finalmente la base de datos quedó constituida del modo siguiente:

	Serie de Entrenamiento	Serie de Prueba	Serie Externa
Activos	350	150	260
Inactivos	350	150	260

E1.2.2. Desarrollo, fusión y validación de modelos

La formación de modelos por familias y a partir de variables selectas, así como la fusión de modelos se llevó a cabo según se describió anteriormente para los anti-leishmaniales. Adicionalmente, se empleó como técnica de modelación el análisis de k-vecinos más cercanos (k-NN, por sus siglas en inglés derivadas de *K-nearest neighbors*).

Para el análisis de k-NN se emplearon dos grupos de variables, de los cuales el primero estuvo constituido por las 109 variables de los modelos obtenidos por análisis discriminante lineal. Para formar el segundo grupo se calcularon los descriptores 0-2D implementados en el programa DRAGON, se eliminaron los constantes (1208), casi constantes (83), los que no fueron calculados para alguna molécula (26) y los altamente correlacionados ($r > 0.9$, 1431 descriptores), exportándose un fichero único de 1015 descriptores. Luego de eliminar aquellos cuya frecuencia de valores igual a cero fue superior al 80% (475) se logró una reducción final de este segundo grupo a 540 variables. Con estas se realizó un ordenamiento del nivel de importancia mediante el módulo de selección de variables implementado en STATISTICA en el menú de minería de datos (*Feature screening-variable selection*) y se obtuvieron los modelos con subgrupos de grupos de variables de tamaño creciente entre las de mayor relevancia.

Automáticamente, las variables fueron normalizadas y las distancias entre las moléculas fueron ponderadas. Como métricas de distancia se emplearon las distancias de Euclides y de Manhattan. El valor óptimo de k se obtuvo por validación cruzada de la serie de entrenamiento, fraccionando la misma en diez partes aleatorias y excluyendo una de ellas en cada corrida.

Una vez escogidos los mejores modelos por familia de descriptores según ADL y los obtenidos por k-NN con los dos grupos de variables se fusionaron los modelos siguiendo igual procedimiento al que se describió previamente para los anti-leishmaniales. La robustez del sistema de clasificación escogido se evaluó por validación cruzada dejando el 10% de los compuestos fuera en cada corrida (LGO) y mediante aleatorización de la variable respuesta, según se describió anteriormente para los modelos anti-leishmaniales.

Para seleccionar un valor de corte de probabilidad y clasificar los compuestos de actividad desconocida se determinó la sensibilidad, especificidad, precisión y probabilidad posterior usando distintos valores de probabilidad promedio. El cálculo de las probabilidades posteriores se realizó empleando el teorema de Bayes^[168-170] adaptado a un problema de clasificación binario (activos/inactivos) según se describió en la página 70, ecuación 13. Considerando el escenario de la base de datos original, de la cual 250'740 compuestos subsistieron al curado estructural y fueron considerados inactivos, se estimó una $p(I) = 0.9948$. Por su parte, los 1'312 activos representan una $p(A) = 0.0052$.

E1.2.3. Predicción de la actividad anti-*T. cruzi*

Para estimar la cobertura del dominio de aplicación de los modelos y para la búsqueda de compuestos con potencialidad como anti-chagásicos se emplearon las mismas bases de datos de 10'747 y 9'258 estructuras usadas para los modelos de predicción anti-leishmanial.

Se calcularon las probabilidades por los modelos independientes y luego se fusionaron para cada compuesto solo los resultados de aquellos modelos que los incluían en su dominio de aplicación. Teniendo en cuenta los resultados del ensamble y los antecedentes fármaco-toxicológicos de cada compuesto se realizó una selección de los productos con mayor potencialidad para evaluarlos en los sistemas biológicos.

E2. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de compuestos potencialmente activos según modelos de predicción

Además de los compuestos potencialmente activos, se evaluó un grupo de ellos teóricamente inactivos como medio de validación experimental de los modelos. Primariamente fueron probados en un ensayo de actividad parasitocida a diferentes concentraciones frente a promastigotes de *L. amazonensis*. Aquellos con CPM inferiores a 10 µg/mL fueron ensayados posteriormente en un rango de concentraciones apropiado para determinar su actividad inhibitoria del crecimiento (CI₅₀) frente a promastigotes y la citotoxicidad (CC₅₀) para las células KB. Los productos con un índice de selectividad superior a 10 fueron enfrentados a amastigotes intracelulares y macrófagos peritoneales de ratón para determinar las concentraciones eficaces (CE₅₀) y citotóxicas (CC₅₀) en estos modelos. Los compuestos con un perfil de actividad/citotoxicidad adecuado fueron entonces probados *in vivo* en un modelo de leishmaniosis cutánea experimental.

E2.1. Actividad anti-leishmanial

E2.1.1. Parásitos y cultivos

Se usaron cepas de referencia de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *L. infantum* (MHOM/FR/78/LEM75) y *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2 903) gentilmente donadas por la Doctora Ana Margarita Montalvo, Jefa del Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, La Habana, Cuba. Los promastigotes se cultivaron a 26 °C en medio de Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Hyclone®, Logan, Utah) inactivado (56 °C, 30 min) y se mantuvieron en multiplicación exponencial mediante pases cada 3-4 días.

E2.1.2. Curvas de crecimiento

El siguiente procedimiento se siguió para las tres especies de *Leishmania* empleadas en el estudio. Las primeras seis columnas de la placa de 96 pozos fue sembrada con 200 µL conteniendo 5x10⁵ promastigotes/mL. Un volumen similar de medio de cultivo

(sin parásitos) se agregó a la otra mitad de la placa. Inmediatamente después de sembrar la placa y cada 24 h, se agregaron a los pozos de una fila 5 µL de anfotericina B (Fungizone™, Bristol Myers Squibb, France) con una concentración de 2 µg/mL. De este modo se contó con cultivos inactivados cada 24 h desde el momento de la siembra hasta 7 días después. Luego de los siete días de incubación a 26 °C se agregaron a cada pozo 20 µL de p-nitro-fenilfosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) a una concentración de 20 mg/mL en acetato de amonio (pH 5.5) preparado en Tritón X100 al 1%. Luego, las placas fueron incubadas durante otras 3 h a 37 °C para entonces leer las absorbancias en un lector de placas (*Tecan infinite200 Pro microplate reader*) a 405 nm. Las absorbancias netas de cada día se calcularon sustrayendo la media de las absorbancias de los seis pozos de la derecha (medio de cultivo + anfotericina B) a la media de los seis pozos correspondientes a su izquierda (medio + parásitos + anfotericina B). Se graficaron los valores de absorbancias netas promedio en función del tiempo para obtener las curvas de crecimiento de cada cepa.

E2.1.3. Compuestos a ensayar

Se emplearon los ingredientes farmacéuticamente activos de medicamentos en uso con indicaciones diversas y diferentes a la terapéutica de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas. Las muestras de estos compuestos fueron gentilmente gestionados por la Subdirección de Investigaciones de BioCubaFarma con los laboratorios farmacéuticos encargados de la producción en Cuba de las formas terminadas correspondientes. Estas muestras estuvieron acompañadas de sus certificados de calidad y todas fueron aptas para su uso como ingredientes farmacéuticos activos, con una pureza superior al 99.7% en todos los casos. La furvina y sus similares fueron sintetizados en el Centro de Bioactivos Químicos según se ha descrito anteriormente (Castañedo y Gaytan 2003) y cumplieron las especificaciones de calidad establecidas para ellos. Los productos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) a una concentración inicial de 10 mg/mL y luego se realizaron diluciones seriadas para lograr el rango de concentraciones apropiado según el ensayo y la actividad mostrada por los productos.

E2.1.4. Actividad frente a promastigotes

Las concentraciones de producto que inhibieron el crecimiento de los promastigotes a un 50% con respecto al control no tratado (Concentración inhibitoria media o CI_{50}) y la concentración de producto que causó total inhibición de la motilidad de los promastigotes (Concentración parasitocida mínima, CPM) fueron usadas como índices de la actividad *in vitro* frente a los promastigotes.

La CI_{50} se determinó por el método descrito por Bodley y Shapiro.^[221] Resumidamente, la mitad superior de la placa de 96 pozos (filas A-D) fue sembrada con 199 μ L de cultivo con 5×10^5 promastigotes/mL. En los pozos restantes se agregó un volumen similar de medio de cultivo sin parásitos. A cada columna de la placa se asignó una concentración de producto, agregándose en cada pozo 1 μ L del producto disuelto en DMSO. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo fue del 0.5%, la cual se sabe que es inocua para el crecimiento parasitario.^[221] No obstante, en todas las placas se incluyó como control un grupo de pozos tratados con 1 μ L de DMSO.

Luego de la incubación durante 72 h a 26 °C la placa fue observada en el microscopio invertido para evaluar la motilidad de los promastigotes. La CPM se estimó como la media geométrica de las concentraciones (cuatro réplicas) que provocaron la total inhibición del movimiento de los promastigotes. Posteriormente, se añadió a cada pozo 20 μ L de p-nitro-fenilfosfato, se incubó durante 3 h y se leyó a 405 nm según se describió en el acápite de las curvas de crecimiento. La absorbancia neta correspondiente a cada concentración de producto se calculó sustrayendo el promedio de las absorbancias de los pozos E-F (medio de cultivo + producto) al promedio de los pozos A-D de la misma columna (medio de cultivo + producto + una cantidad de parásitos en función del efecto inhibitorio a dicha concentración). Las CI_{50} se estimaron por ajuste no lineal a la curva sigmoide Emax.^[222] Cada ensayo se repitió, al menos, tres veces.

E2.1.5. Citotoxicidad en líneas celulares e índice de selectividad

Los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo por el método descrito por Lorente y colaboradores.^[223] Las placas de 96 pozos fueron sembradas con 100 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bobino conteniendo células HeLa-KB (Sublínea de la línea celular tumoral HeLa formadora de queratina, ATCC, CCL-17™, amablemente donada por el profesor Simon L. Croft de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres) a una concentración de 4×10^4 células/mL. Los cultivos fueron incubados at 37 °C y 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente, el medio fue eliminado y remplazado por medio fresco con los productos en el rango de 30 μ g/mL a 100 ng/mL, por triplicado. Como control positivo se empleó la podofilotoxina (P-4405, Sigma). Las placas fueron incubadas nuevamente durante 72 h en iguales condiciones, luego de lo cual se añadió a cada pozo 10 μ L de Alamar Blue (DAL1025, Thermo Fisher Scientific). Las placas fueron incubadas por otras 4 h antes de leerlas (Excitación 530 nm, Emisión 585 nm, corte 550 nm) en un lector para placas de 96 pozos (*Tecan infinite200Pro microplate reader*). Los valores de CC₅₀ se estimaron igualmente por ajuste no lineal a la curva de sigmoide Emax.^[222] Cada ensayo fue repetido al menos tres veces.

El índice de selectividad de cada compuesto fue calculado dividiendo la CC₅₀ en la línea celular de mamífero entre el promedio de las CI₅₀ frente a los promastigotes de las tres especies de *Leishmania*. En el caso de los derivados 2-nitrovinilfuránicos se evaluó la existencia de una relación entre los valores de CI₅₀ y CC₅₀ mediante el análisis de correlaciones no paramétrico por rangos de Spearman.

E2.1.6 –Relación estructura-actividad en los derivados nitrovinilfuránicos

Se calcularon las cargas de Mulliken en los átomos de los derivados nitrovinilfuránicos empleando el programa Gaussian 09 el cual se basa en la “Teoría de la Densidad Funcional”.^[224] Se evaluó la relación existente entre los valores de CI₅₀ y las densidades de carga en los átomos implicados en el doble enlace exocíclico o la diferencia de cargas entre ambos átomos de carbono.

E2.1.7. Actividad frente a amastigotes intracelulares y citotoxicidad en macrófagos peritoneales de ratón

Los compuestos que resultaron de interés según los ensayos de actividad frente a promastigotes y su citotoxicidad en células KB fueron evaluados frente a amastigotes intracelulares cultivados en macrófagos peritoneales de ratón. Paralelamente, se estudió la citotoxicidad frente a la célula hospedadora.

Para el ensayo de actividad frente a **amastigotes intracelulares** se sacrificaron ratones Balb/c por inhalación de CO₂ y se extrajeron los macrófagos residentes en el peritoneo mediante lavado con medio RPMI 1640 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) a 4°C suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomycin 200 µg/mL). Los macrófagos se distribuyeron a razón de 4×10^4 células/pozo en portaobjetos estériles para cultivo de tejidos de 16 pocillos y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂ durante 2 h. Las células no adheridas fueron eliminadas y el resto fueron infectadas con promastigotes estacionarios de *L. amazonensis* a razón de cuatro parásitos por macrófago. Luego de 4 h de incubación a 37 °C en 5% de CO₂ los promastigotes libres fueron eliminados y se adicionaron 199 µL de medio de cultivo fresco en todos los pozos. Posteriormente a cada pozo se le agregó 1 µL de las soluciones de los productos en DMSO.

Los cultivos fueron incubados nuevamente durante 48 h bajo las mismas condiciones. Luego, los cultivos fueron fijados con metanol y teñidos con Giemsa al 10%. Con ayuda de un microscopio óptico y empleando lente de inmersión (100X) se determinó el porcentaje de macrófagos infectados por conteo de un mínimo de 200 células. Se calculó el porcentaje de reducción de la infección para cada concentración y se estimaron las concentraciones eficaces medias (CE₅₀) mediante ajuste a curvas sigmoides.

El ensayo de **citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratón** se llevó a cabo en placas de 96 pozos y de modo similar al ensayo de citotoxicidad frente a células KB, solo que en lugar de estas se emplearon macrófagos peritoneales de ratón colectados según se describió en el acápite anterior. Además se emplearon cien veces más células por pozo (4×10^6 células/mL) debido a que las células KB se multiplican y

los macrófagos peritoneales no. Este ensayo mide muerte celular, mientras que el de células KB puede medir además la actividad citostática. En cada pozo se colocaron 199 μ L de la suspensión celular y 1 μ L de las soluciones correspondientes de los productos a ensayar. Luego de 48 h de incubación a 37 °C en 5% de CO₂ se agregaron 20 μ L de *Alamar blue* por pozo para realizar la lectura según se describió para el ensayo con células KB. Las CC₅₀ se estimaron mediante ajuste a curvas sigmoides, luego de calcular los porcentos de inhibición de la transformación del cromógeno por los cultivos tratados con respecto a los pozos controles tratados con DMSO.

E2.1.8. Actividad frente a la leishmaniosis cutánea experimental

Una vez demostrada la actividad inhibitoria y parasitocida *in vitro* de algunos compuestos y sobre la base de los estudios de citotoxicidad, de la información toxicológica preclínica existente y luego de realizar algunos ensayos en busca de esquemas de dosificación adecuados, se ejecutó un grupo de experimentos *in vivo* para evaluar la eficacia de cuatro productos contra la leishmaniosis cutánea experimental.

Se probó la meclozina, la tioridazina, la furvina y el UC245 a las dosis máximas toleradas (dosis máxima que toleran los ratones sin morir ni tener pérdidas de peso promedio superiores al 10% del peso inicial). Posteriormente, se probaron dosis inferiores de la tioridazina, diferentes frecuencias de administración de la furvina y el UC245, así como la actividad de la furvina y el UC245 frente a la enfermedad en un estado avanzado. Finalmente, se realizó un estudio de dosis-efecto de la anfotericina B, considerando los bajos valores de actividad *in vivo* observados.

E2.1.8.1. Animales

Se emplearon ratones Balb/c, hembras suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba) con un peso de 16-18 g y 6-8 semanas de edad. Se mantuvieron en condiciones ambientales controladas (temperatura ambiental de 22-25 °C, humedad relativa de 60-65% y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h luz-12 h oscuridad) y fueron manipulados por personal calificado. Al concluir los estudios, los ratones fueron sacrificados mediante una sobredosis de

pentobarbital (100 mg/kg). Los protocolos de los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Finlay, el cual está en concordancia con los estándares y legislaciones internacionales sobre este tópico.^[225]

E2.1.8.2. Tratamiento experimental con meclozina, tioridazina y furvina

Se infectaron 90 ratones por inoculación intradérmica en los cojinetes plantares con 5×10^6 promastigotes de *L. amazonensis* en fase estacionaria. Cinco semanas después, los ratones fueron aleatorizados en grupos de diez y luego se trataron diariamente por vía intraperitoneal durante 14 días con los compuestos de prueba. La meclozina fue administrada a dosis de 100 y 50 mg/kg, la tioridazina a 50 y 25 mg/kg, la furvina a 5 y 2 mg/kg y la anfotericina B, a 1 mg/kg. Se incluyeron además dos controles de solventes: el Miglyol 810 (Hüls AG, Alemania) que es el solvente de la furvina y la solución salina fisiológica que se empleó para el resto de los productos. Otro grupo de ratones infectados no recibió tratamiento alguno y sirvió como grupo control.

Semanalmente se midió el diámetro dorso-plantar de las extremidades posteriores empleando un cutímetro (Kröplin, Längenmesstechnik, error de medición 0.05 mm). El tamaño de las lesiones se calculó sustrayendo el valor de la medición de la pata no infectada al de la infectada.

La estimación de la carga de amastigotes en el tejido lesional se realizó mediante la técnica de diluciones seriadas límites o LDA (de sus siglas en inglés *Limiting Dilution Assay*).^[226] Para ello se sacrificaron cuatro ratones por grupo una semana después de concluido el tratamiento. Luego de la desinfección local con etanol 70% se tomaron asépticamente muestras del tejido lesional, las cuales fueron pesadas y maceradas sobre un fragmento de gasa estéril en placas Petri que contenían 4 mL de medio de Schneider suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (ver acápite Parásitos y cultivos). De estos macerados se transfirió una muestra de 20 μ L al primer pocillo de una placa de 96 pozos con 180 μ L de igual medio de cultivo. En los restantes pozos se hicieron diluciones seriadas 1:4. Las placas fueron selladas e incubadas a 26 °C durante 7 días para finalmente evaluar el crecimiento de los promastigotes en un

_____ *Materiales y Métodos* _____

microscopio invertido. La carga de parásitos por gramo de tejido se calculó mediante la fórmula:

$$CP(\text{parásitos/g}) = 2000 \times 4^{d-1}/p \quad \text{Ecuación 15}$$

Donde p es el peso (g) de la muestra y d la mayor dilución en que se observó crecimiento de promastigotes. Se consideró el primer pozo de la placa como $d=1$. La cantidad mínima de parásitos que pudo detectarse en la placa por este procedimiento fue 2×10^3 . Es por ello que a las muestras que no tuvieron crecimiento en el primer pozo se les asignó un valor de $\frac{10^3}{p}$, o sea, la mitad del límite de detección dividido entre el peso de la muestra.

El tamaño de las lesiones en los distintos grupos fue comparado mediante análisis de varianza de mediciones repetidas y, en caso de existir diferencias estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de diferencias significativas mínimas de Fisher para comparaciones múltiples y la prueba de Dunnett para realizar comparaciones respecto al grupo control. Se empleó en todos los casos el paquete estadístico STATISTICA^[153] y se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

E2.1.8.3. Estudio comparativo de Furfina y UC245

Se infectaron 10 ratones por grupo, de modo similar al experimento anterior. Una vez que las lesiones fueron evidentes, los ratones fueron aleatorizados, asignados a los distintos grupos experimentales y tratados con furfina a 5 mg/kg, UC245 a 100 mg/kg o anfotericina B a 1 mg/kg. Se incluyó un grupo control que no recibió tratamiento alguno. Igualmente, todos los productos fueron administrados cada 24 h, durante 14 días consecutivos. El tamaño de las lesiones fue medido cada semana después de iniciado el tratamiento durante un mes.

E2.1.8.4. Estudio comparativo de Furvina y UC245 en régimen de administración cada 12h

Este ensayo se llevó a cabo esencialmente del mismo modo al anterior. No obstante, los tratamientos se administraron cada 12 h, la dosis de furvina se redujo a 2 mg/kg, mientras que el UC245 se mantuvo a 100 mg/kg.

E2.1.8.5. Actividad de Furvina y UC245 frente a la leishmaniosis cutánea avanzada

Los ratones fueron infectados de forma similar a los experimentos anteriores, el tratamiento también se administró cada 12 h, pero este se inició a las 18 semanas post-infección. Igualmente, la anfotericina B se empleó como control positivo, aunque a 5 mg/kg y en días alternos.^[227]

E2.1.8.6. Estudio de dosis-efecto de tioridazina y anfotericina B frente a la leishmaniosis cutánea experimental

Los ratones fueron infectados con 10^7 promastigotes en fase estacionaria y una semana después fueron aleatorizados, asignados a los grupos experimentales y tratados con tioridazina a 25, 20, 15, 10 y 5 mg/kg o anfotericina B a 5, 7.5, 10 y 12.5 mg/kg. Ambos productos fueron administrados por vía intraperitoneal, pero la tioridazina fue dosificada cada 12 h, mientras que la anfotericina B se administró cada 48 h.

E3. Actividad anti- *Trypanosoma cruzi*

Se sembraron mioblastos esqueléticos de rata (Línea L-6, *European Collection of Animal Cell Cultures*, Salisbury, Reino Unido) en placas de cultivo de 96 pozos a razón de 2'000 células por pozo en 100 μ L de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y L-glutamina 2 mM. Luego de 24 h de incubación a 36 °C y 5% de CO₂, el medio fue eliminado y remplazado por otros 100 μ L de medio fresco con 5'000 trypomastigotes de *T. cruzi* (MHOM/CL/00/Tulahuen) cepa Tulahuen C2C4 transfectada con el gen *LacZ* para la expresión de la β -galactosidasa.^[228] Dieciocho horas después, el medio fue nuevamente eliminado, pero esta vez fue remplazado por 100 μ L medio que contenía diluciones seriadas de los compuestos a probar. Se emplearon siete

diluciones triples que abarcaron un rango de concentraciones de 90-0.123 µg/mL, incluyendo tres réplicas por concentración. Luego de 96 h de incubación las placas fueron observadas al microscopio invertido para comprobar el crecimiento de los controles, el efecto parasitocida y la ausencia de contaminaciones. Entonces se agregaron 50 µL del sustrato CPRG/Nonidet y se dejó desarrollar la reacción durante 4 h para leer las absorbancias a 540 nm en un lector de placas (*Tecan infinite200 Pro microplate reader*). Los datos fueron ajustados por regresión no-lineal a la curva de Emax sigmoidea y se estimaron los valores de CI_{50} y sus intervalos de confianza para el 95%.^[229]

La citotoxicidad de los compuestos frente a la línea celular hospedera se evaluó independientemente de los ensayos de actividad en cultivos no infectados con igual densidad de células por pozo y tiempo de incubación. La viabilidad celular se midió por adición de *Alamar blue* y lectura de fluorescencia según se describió anteriormente para el ensayo de citotoxicidad con células KB.

E4. Actividad cruzada de compuestos anti-leishmaniales y anti-*T. cruzi*

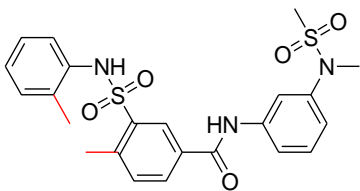
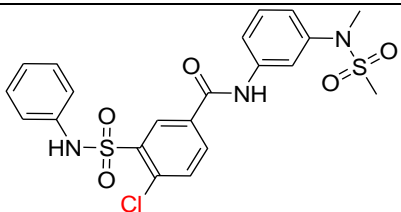
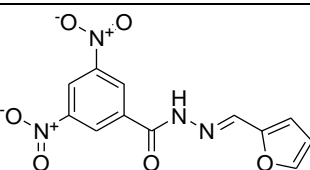
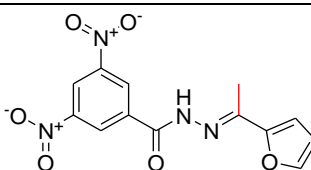
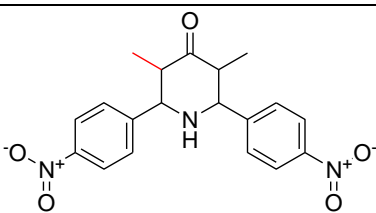
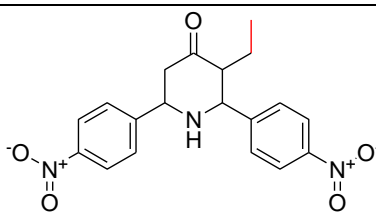
Se estudió la correlación entre las predicciones de los modelos anti-leishmaniales y anti-*T. cruzi* para los 9258 compuestos que constituyeron el universo de búsqueda y que representan las bases datos de fármacos licenciados luego del curado estructural (Véase acápite “E1.1.6. Predicción de la actividad anti-*L. major*”). Debido a que estas variables mostraron distribuciones distintas y además significativamente diferentes de la distribución normal (Prueba de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0.01$), se empleó el coeficiente de correlaciones por rangos de Spearman para analizar la relación entre ellas. Posteriormente se evaluaron frente a *T. cruzi* los compuestos con mejores perfiles de actividad anti-leishmanial y, contra *L. amazonensis*, los productos con probado efecto *in vitro* frente a *T. cruzi*.

F. RESULTADOS

F1. Estudios *in silico*

De la fase preparatoria de las bases de datos consideramos interesante resaltar la importancia del curado estructural y de actividad. La minuciosa identificación y eliminación de compuestos muy parecidos estructuralmente (**Tabla 4**) y con actividad diferente y la homogeneización de la representación de las subestructuras resultó un paso clave.

Tabla 4: Ejemplos más relevantes de compuestos formadores de precipicios actividad en las bases de datos de *L. major* y *T. cruzi*.

Base de datos	Tanimoto	Activo	Inactivo
<i>L. major</i>	0.933		
	0.907		
<i>T. cruzi</i>	0.940		

F1.1. Modelos matemáticos para predecir actividad contra promastigotes de *L. major*

Mediante el análisis discriminante lineal se logró un grupo de modelos con distinto grado de calidad y valor predictivo según las familias de descriptores (**Anexo1**). De

____ Discusión ____

modo general se obtuvieron modelos de 3-10 variables con una exactitud en la predicción de la serie externa de 76.6-89.7, una tasa de falsos positivos de 8.2-20.5, un coeficiente de Matthews de 0.53-0.79, una λ de Wilks de 0.42-0.66 y un cuadrado de la distancia de Mahalanobis entre las medias de las clases de 2.1-5.5. Sin embargo, al agrupar las variables de los modelos anteriores se encontró que, con una dimensión óptima de cuatro variables, se mejora sustancialmente la calidad de los mismos (**Anexo 2**). Para los diez mejores modelos de cuatro variables se alcanzaron valores de exactitud en la clasificación de la serie externa de 88.3-89.6%, tasa de falsos positivos de 9.1-10.9%, coeficiente de Matthews de 0.77-0.79, λ de Wilks de 0.41-0.42 y distancias de Mahalanobis de 5.6-5.7.

La fusión por promedio, máximo y mediana de las probabilidades mostraron resultados similares, siendo ligeramente superiores los dos últimos (**Tablas 5 y 6**). Sin embargo, la fusión por el producto de las probabilidades tuvo un desempeño notablemente inferior. Varias corridas con distintos conjuntos de variables mostraron repetidamente la inferioridad de este método de fusión.

Tabla 5: Desempeño de las mejores fusiones de modelos en la serie de prueba

Modelos	C	Q	Se	Sp	FAR	F	Pr
7-2D_28-2D_1-2Ds_4-2Ds_A	0.84	91.8	89.7	90.1	10.3	89.9	90.1
3-2Ds_6-2Ds_P	0.76	87.3	77.1	81.0	22.9	79.0	80.2
7-2D_1-2Ds_2-2Ds_X	0.84	91.9	90.3	90.6	9.7	90.5	90.6
7-2D_28-2D_1-2Ds_4-2Ds_M	0.84	92.1	89.9	90.3	10.1	90.1	90.3

Tabla 6: Desempeño de las mejores fusiones de modelos en la serie externa

Modelos	C	Q	Se	Sp	FAR	F	Pr
7-2D_28-2D_1-2Ds_4-2Ds_A	0.84	91.8	89.4	89.9	10.6	89.6	89.8
3-2Ds_6-2Ds_P	0.76	87.2	76.9	80.9	23.1	78.8	80.1
7-2D_1-2Ds_2-2Ds_X	0.84	91.8	90.1	90.5	9.9	90.3	90.4
7-2D_28-2D_1-2Ds_4-2Ds_M	0.84	92.0	89.7	90.1	10.3	89.9	90.1

Consistentemente las fusiones por medianas y máximos fueron ligeramente superiores a los otros dos métodos, tanto en la serie de prueba como en la serie externa. Al evaluar el dominio de aplicación de estos dos multclasificadores con una base de datos constituida por 24'152 estructuras pertenecientes a fármacos (**Tabla 7**) pudo comprobarse que el incremento de una variable (fusión por medianas vs máximo) solo aumentó el número de compuestos incluidos en el dominio de aplicación por consenso en un 0.17% y mejoró la clasificación general en un 0.2%. Por consiguiente, se eligió como multclasificador para la búsqueda de compuestos anti-leishmaniales el constituido por la fusión por el máximo de las probabilidades de los modelos 7-2D, 1-2Ds y 2-2Ds. Este ensamble mostró también la tasa más baja de falsos positivos y los valores más altos de sensibilidad, especificidad y precisión.

Tabla 7: Por ciento de compuestos incluidos en el dominio de aplicación de los modelos y las fusiones por máximo y mediana de las probabilidades

Modelo	Rangos	Distancia de Euclides	Distancia de Manhattan	Densidad de probabilidad	Consenso
7- Matriz-2D	80.0	94.7	94.6	84.8	94.5
28-Propiedades moleculares	90.7	98.7	98.4	96.0	98.5
1-2Ds	96.1	98.7	98.7	97.6	98.7
2-2Ds	96.9	99.0	98.9	97.7	98.9
4-2Ds	96.6	99.0	99.0	97.7	99.0
pMax(7-1-2)	96.7	99.0	98.9	97.3	98.9
pMedian(7-28-1-4)	97.3	99.1	99.1	97.5	99.1

pMax(7-1-2): probabilidad máxima de los modelos 7-Matriz-2D, 1-2Ds y 2-2Ds; **pMedian(7-28-1-4):** mediana de las probabilidades según los modelos 7-Matriz-2D, 28-Propiedades moleculares, 1-2Ds y 2-2Ds

La validación cruzada de los modelos seleccionados empleando el método de fraccionar aleatoriamente la serie de los compuestos de entrenamiento en diez partes, excluir una en cada corrida y evaluar la exactitud de clasificación en la serie de prueba mostró (**Tabla 8**) valores de exactitud promedio muy próximos a los alcanzados con la base de datos íntegra. Por el contrario, al aleatorizar la variable dependiente (actividad

____ Discusión ____

observada) se comprobó un empobrecimiento sustancial de la capacidad de clasificación de los modelos, con valores de exactitud cercanos al 50%. Ambos procedimientos demostraron la robustez del sistema de clasificación desarrollado.

Tabla 8: Medidas de robustez de los modelos en la serie de prueba

Modelos	Q%	Q _{LGO} %		Q _{aleat} %	
		Media	Min-Max	Media	Min-Max
7- Matriz-2D	89.7	87.9	87.2-89.8	52.7	41.7-63.9
1-2Ds	89.6	88.4	87.1-90.2	53.3	47.2-58.6
2-2Ds	89.5	88.6	87.7-89.6	51.9	43.0-60.4
Fusión-pMax	91.9	89.8	88.8-91.7	54.5	42.0-67.1

Q_{LGO}%; Exactitud de los modelos por el método de LGO; Q_{aleat}%; Exactitud de los modelos luego de aleatorizar la variable respuesta; Fusión-pMax: Multiclasificador obtenido por la fusión de los tres modelos independientes mediante el máximo de las probabilidades

Excluyendo los derivados de antimonio pentavalente que son organometálicos y no se incluyen en el dominio de aplicación de los modelos, los cuatro fármacos anti-leishmaniales en uso fueron clasificados como potencialmente activos por el ensamble de modelos (**Tabla 9**).

Tabla 9: Clasificación *in silico* de los fármacos anti-leishmaniales en uso clínico (excepto antimoniales)

Fármaco	pMax	pMax(+)	pMax(-)
Anfotericina B	0.9999	0.9999	0.0001
Pentamidina	0.7271	0.7271	0.6350
Miltefosina	0.9992	0.9992	0.1784
Paromomicina	0.9984	0.9984	0.4818

pMax: probabilidad máxima por la que el ensamble realiza la clasificación; **pMax(+):** máxima probabilidad de ser activo según los tres modelos independientes; **pMax(-):** probabilidad máxima de ser inactivo según los tres modelos por separado

El dominio de aplicación del multclasificador mostró una amplia cobertura estructural de las cuatro bases de datos de medicamentos empleadas como universo de búsqueda (**Tabla 10**). En todos los casos quedó incluido más del 95% de los compuestos examinados.

Tabla 10: Nivel de cobertura de compuestos por el dominio de aplicación de la fusión de modelos

Base de datos	Número de compuestos	En el dominio de aplicación	%
Cuadro Básico Cuba	424	409	96
DrugBank	1348	1298	96
Genéricos	6296	6162	98
FDA	1216	1207	99

Al emplear el ensamble para clasificar las estructuras de los ingredientes farmacéuticamente activos de fármacos con otras indicaciones pudo comprobarse que ha sido descrita en la literatura científica la actividad anti-leishmanial de 29 compuestos que fueron también clasificados como probablemente activos por el multclasificador (**Tabla 11**). A su vez, coincide que tres compuestos teóricamente inactivos ya han sido informados como inactivos experimentalmente frente a *Leishmania*. Sin embargo, la hidroxiurea fue clasificada como inactiva por los modelos y existen referencias de su actividad anti-leishmanial *in vitro* incluso a concentraciones inferiores a las requeridas para inhibir la proliferación de células tumorales.^[230, 231] Salvo esta excepción, los resultados apoyan la capacidad predictiva del sistema de clasificación utilizado.

Tabla 11: Compuestos con actividad anti-leishmanial descrita en la literatura coincidente con los modelos de predicción *in silico*.

Nombre	Acción	pMax	Referencias
Amiodarona	Anti-arrítmico	0.999	6 (+)
Amitriptilina	Antidepresivo	0.975	1 (+)
Atazanavir	Anti-retroviral	0.998	1 (+)
Claritromicina	Antibiótico	0.999	1 (+)
Clofazimine	Antimicótico, anti-leproso	0.999	6 (+)
Cloroquina	Antiparasitario, antirreumático	0.876	52 (+)
Clotrimazol	Antifúngico	0.994	3 (+)
Daunorubicina	Antibiótico, antineoplásico	0.966	24 (+)
Desipramina	Antidepresivo	0.884	1 (+)
Hidroxiurea	Antineoplásico	-1.000	2 (+)
Imatinib	Antineoplásico	0.989	1 (+)
Imipramina	Antidepresivo	0.915	5 (+)
Indinavir	Anti-retroviral	0.999	4 (+)
Itraconazol	Antifúngico	0.998	51 (+)
Ivermectina	Antihelmíntico	0.999	10 (+)
Ketoconazol	Antifúngico	0.891	93 (+)
Lopinavir	Anti-retroviral	0.999	2 (+)
Mefloquina	Antimalárico	0.759	5 (+)
Miconazol	Antifúngico	0.927	6 (+)
Nelfinavir	Anti-retroviral	0.999	1 (+)
Nistatina	Antifúngico	0.999	19 (+)
Piperacilina	Antibiótico	0.999	1 (+)
Prostaciclina	Antiagregante plaquetario	0.680	1 (+)

Quinacrina	Antiparasitario	0.996	9 (+)
Ritonavir	Anti-retroviral	0.999	2 (+)
Saquinavir	Anti-retroviral	0.998	4 (+)
Sertralina	Antidepresivo	0.921	1 (+)
Tamoxifeno	Antitumoral	0.999	6 (+)
Trifluoperazina	Ansiolítico, anti-psicótico	0.829	8 (+)
Estavudina	Anti-VIH, antimetabolito, antineoplásico	-0.999	2 (-)
Ganciclovir	Antiviral	-0.999	6 (-)
Mebendazol	Antiparasitario	-0.576	1 (-)

Se realizó una selección de compuestos considerando las predicciones de los modelos, la indicación primaria, la vía de administración, seguridad, disponibilidad, entre otros. Los veinte compuestos potencialmente activos selectos para los ensayos *in vitro* fueron: natamicina, atorvastatina, meclozina, tioridazina, clomifeno, doxorubicina, carvedilol, loratadina, haloperidol, amikacina, papaverina, furvina, droperidol, dobutamina, toxoflavina, midazolam, difenhidramina, camilofina, dimenhidrinato y bupivacaina. Además se seleccionaron otros 16 compuestos predichos como inactivos para valorar experimentalmente la especificidad de los modelos. Estos fueron: atropina, diazepam, levamisol, lidocaína, metoclopramida, epinefrina, furosemida, dipirona, nicetamida, pilocarpina, ácido tranexámico, meropenem, piperazina, aminofilina, acetil cisteína y dinitrato de isosorbida.

F1.2. Modelos matemáticos para predicción de actividad contra amastigotes de *T. cruzi*

Los modelos obtenidos por análisis discriminante lineal resultaron poco eficientes en la diferenciación de compuestos activos frente a amastigotes de *T. cruzi* a concentraciones inferiores a 1 μM (**Anexo 3**). Por este método se lograron exactitudes en la clasificación de la serie de prueba de 45.3-75.3%, λ de Wilks de 0.63-0.89, distancias entre los centroides de 0.1-2.3; C de Matthews de -0.01-0.51; tasas de falsos

____ *Discusión* ____

positivos de 18.0-64.7% y valores de precisión de 46.1-78.0%. Al conjugar las variables de los modelos por familias se obtuvieron cuatro modelos con mejores indicadores: exactitud, 77.0-80.3%; λ de Wilks, 0.52-0.62; CDM, 3.1-3.7; FAR, 20.7-24.7% y precisión, 76.1-79.7%). Sin embargo, el desempeño fue insuficiente incluso después de la fusión de estos modelos (resultados no mostrados). Es por ello que se intentó la modelación por análisis de k-vecinos más cercanos.

Con las variables de los modelos obtenidos mediante análisis discriminante lineal se alcanzaron por k-NN resultados comparables a los anteriores: exactitud, 76.3-79.7%; C de Matthews, 0.53-0.59; FAR, 20.7-26.0% y precisión, 75.2-78.9% (**Anexo 4**). Con un segundo grupo de variables escogidas empleando el módulo de selección de variables implementado en el programa STATISTICA se obtuvieron resultados ligeramente mejores: exactitud, 79.0-82.0%; C de Matthews, 0.59-0.64; FAR, 20.7-32.0% y precisión, 73.9-79.9% (**Anexo 5**).

Al combinar los mejores modelos obtenidos por ADL y k-NN mediante métodos de fusión (promedio, máximo y mediana de las probabilidades) se lograron resultados superiores a los alcanzados con los modelos independientes (**Tabla 12**). Se obtuvieron en la serie de prueba valores de exactitud, sensibilidad, especificidad y precisión de 84-88%. La fusión de modelos con mejores indicadores fue por el promedio de las probabilidades de tres modelos. Con esta se logró en la serie externa una clasificación correcta del 85.4% de las moléculas, una precisión de 84.8% y un dominio de aplicación de vasta cobertura (**Tabla 13**).

Tabla 12: Desempeño en la serie de prueba de las mejores fusiones de modelos por cada método de combinación

Fusiones	Método	C	Q	Se	Sp	Pr	DA
ADL21_FS4_FS12	Promedio	0.72	86.0	88.0	84.0	87.6	99.8
kL9_kL10_FS4	Máximo	0.72	86.0	86.7	85.3	86.5	98.3
kL9_FS4	Mediana	0.73	85.7	86.0	85.4	85.9	97.8

Tabla 13: Desempeño en la serie externa de los modelos independientes y su fusión mediante promedio de las probabilidades

Modelos	C	Q	Se	Sp	Pr	DA
ADL21	0.52	75.1	61.1	89.1	84.9	99.7
FS4	0.60	80.0	83.4	76.6	78.1	97.1
FS12	0.65	82.6	85.7	79.4	80.6	96.8
Fusión-Promedio	0.71	85.4	86.3	84.5	84.8	99.8

Las curvas ROC de estos modelos (**Gráfico 1**) también evidenciaron su adecuado desempeño, en particular los modelos de k-NN que poseen un área bajo la curva superior (AUC) a 0.9. La fusión de los modelos muestra el mejor comportamiento con un AUC=0.913 en la serie externa.

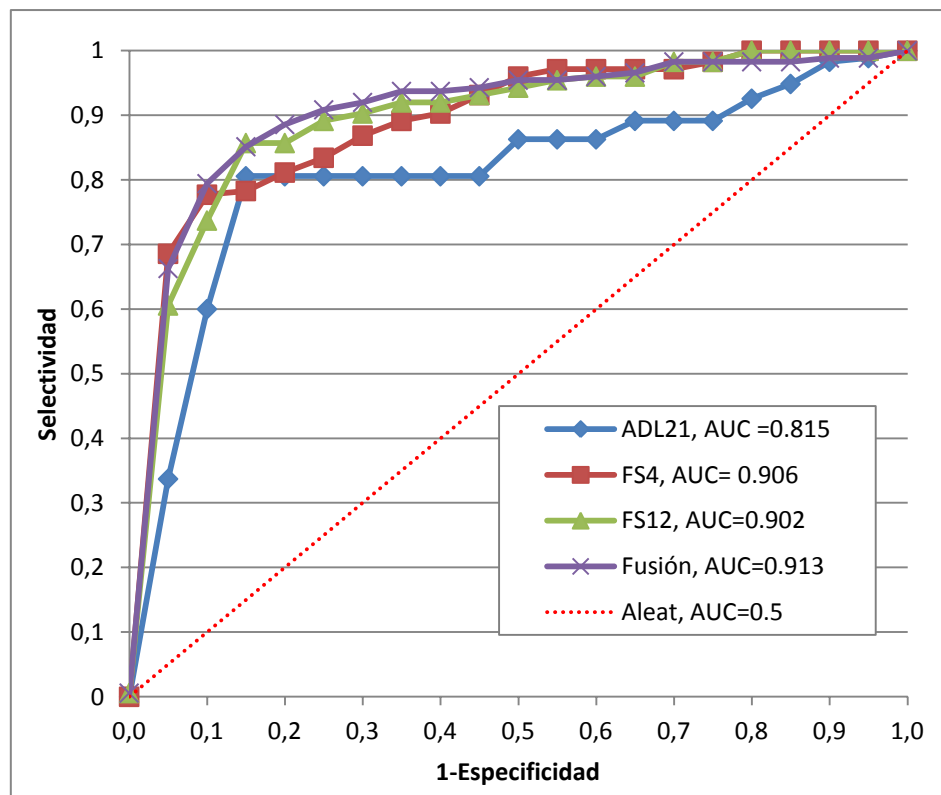


Gráfico 1: Curvas ROC mostrando el desempeño en la serie externa de los modelos independientes y su fusión mediante promedio de las probabilidades

____ Discusión ____

La validación cruzada dejando grupos aleatorios de compuestos fuera de la serie de entrenamiento mostró valores de exactitud promedio muy próximos a los alcanzados con la base de datos íntegra (**Tabla 14**). Por el contrario, al aleatorizar la variable dependiente (actividad observada) se comprobó un empobrecimiento sustancial de la capacidad de clasificación de los modelos, con valores de exactitud cercanos al 50%. Ambos procedimientos demostraron la robustez del sistema de clasificación desarrollado.

Tabla 14: Medidas de robustez de los modelos en la serie de prueba

Modelos	Q%	Q _{LGO} %		Q _{aleat} %	
		Media	Min-Max	Media	Min-Max
ADL21	73.0	74.4	71.7-76.0	55.6	38.7-70.7
FS4	80.7	79.9	78.7-81.3	51.0	46.3-57.7
FS12	81.3	80.6	77.7-81.7	52.3	44.7-58.0
Fusión-Promedio	86.0	85.8	84.3-86.7	51.5	47.0-59.0

Q_{LGO} %: Exactitud de los modelos por el método de LGO; Q_{aleat} %: Exactitud de los modelos luego de aleatorizar la variable respuesta; Fusión-Promedio: Multiclasificador obtenido por la fusión de los tres modelos independientes mediante el promedio de las probabilidades

La cantidad de compuestos clasificados como potencialmente activos por el ensamble varió en función del nivel de corte escogido (**Tabla 15**). Para valores de probabilidad superiores a 0.5 clasificaron como activos aproximadamente el 30%, mientras que al aumentar el nivel de corte a 0.9 solo clasificaron como activos cerca del 3% de los compuestos, existiendo poca diferencia en las proporciones entre las bases de datos.

Tabla 15: Compuestos clasificados como activos por el ensamble de modelos según el nivel de corte seleccionado

Base de Datos	N	N _{in}	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.95
Genéricos	6296	6264	2072	1627	1190	697	220	68
Cuadro Básico Cuba	424	424	116	90	61	33	10	3
DrugBank	1348	1347	402	317	236	137	42	12
FDA	1216	1216	366	284	212	124	36	11

Los valores de corte por encima de una probabilidad de 0.7 brindaron un balance adecuado de sensibilidad y especificidad, lográndose una precisión superior al 90% (Tabla 16).

Tabla 16: Balance de sensibilidad, especificidad y precisión según los niveles de corte escogidos

Índice	p>0.5	p>0.6	p>0.7	p>0.8	p>0.9	p>0.95
Sensibilidad	86.3	79.4	70.3	49.7	30.3	10.9
Especificidad	84.5	89.1	93.7	97.1	98.9	100
Precisión	84.8	87.9	91.8	94.5	96.5	100
$p(A/At)$	0.028	0.037	0.055	0.082	0.126	1.00
$p(A/At)/p(A)$	5	7	11	16	24	192

$p(A/At)$: Probabilidad posterior calculada según teorema de Bayes. Representa la probabilidad del compuesto ser activo si fue clasificado como activo por el modelo.

$p(A/At)/p(A)$: Relación entre la probabilidad posterior y la frecuencia de compuestos activos, considerando esta última similar a la de la base de datos empleada para el desarrollo de los modelos [$p(A)=0.0052$].

Se aplicó el teorema de Bayes^[168] para estimar las probabilidades posteriores en el contexto de la base de datos original, en la que solo 1'312 mostraron una $Cl_{50} < 1\mu M$ [$p(A)=0.0052$]. Se obtuvieron valores aparentemente bajos de probabilidad posterior, con los límites de corte en el intervalo de $0.5 \leq p \leq 0.9$. Sin embargo, estos valores representan desde 5 hasta 24 veces mayor eficiencia en la identificación de

____ Discusión ____

compuestos activos mediante la clasificación por los modelos al compararlos con una selección aleatoria (ensayo-error). Para valores de p superiores a 0.95, es **teóricamente** un suceso cierto que el compuesto sea realmente activo, siempre que la proporción de compuestos activos en la base de datos a explorar sea similar a la de esta.

El modelo FS4 clasificó correctamente uno de los dos fármacos en uso para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (**Tabla 17**). Sin embargo, tanto los modelos ADL21 y FS12 como la fusión de modelos, clasificaron correctamente los dos fármacos.

Tabla 17: Clasificación virtual de los medicamentos en uso para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas

Producto	pADL21	pFS4	pFS12	pMedia	Clasificación
Nifurtimox	0.739	0.914	0.682	0.778	Activo
Benznidazol	0.762	0.261	1.00	0.675	Activo

Sesentaíun fármacos pertenecientes al Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba fueron clasificados como potencialmente activos ($p > 0.7$). Existen antecedentes de su evaluación frente a *T. cruzi* de 18 de ellos, siendo activos experimentalmente todos, excepto el levamisol (**Tabla 18**). Esto no significa necesariamente que su actividad descrita sea a concentraciones inferiores a 1 μM (según debe predecir el modelo), pero avala la utilidad del sistema de clasificación desarrollado como instrumento de búsqueda de compuestos activos; ya que estos compuestos han resultado interesantes a la vista de otros investigadores siguiendo hipótesis de diversa naturaleza.

Los compuestos que clasificaron como activos con una probabilidad superior a 0.95 fueron la **trifluoperazina** (0.9589), la **meclozina** (0.9757) y la **quetiapina** (0.9784). Se conoce que la trifluoperazina afecta la regulación de los niveles de Ca^{2+} intracelular en *T. cruzi* por inhibición de la incorporación por parte de la mitocondria y del retículo endoplasmático; provocando además inhibición de la respiración y colapso del potencial de membrana mitocondrial a través de mecanismos independientes de la inhibición de

la calmodulina.^[232, 233] La trifluoperazina inhibe la replicación, diferenciación y la penetración de *T. cruzi* a las células hospederas.^[234, 235]

Tabla 18: Medicamentos pertenecientes al Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba que resultaron teóricamente activos ($p > 0.7$) y que han sido probados anteriormente frente a *T. cruzi*

Nombre	Acción	pMedia	REF
Trifluoperazina	Anti-psicótico	0.959	5
Nitrofurazona	Antibiótico	0.914	30
Tamoxifeno	Antiestrógenos	0.905	1
Cloroquina	Amebicida, anti-malárico, antirreumático	0.887	1
Imipramina	Antidepresivo	0.887	1
Quinacrina	Anti-giardiasico	0.885	6
Clorpromazina	Anti-psicótico, anti-emético	0.877	16
Levomepromazina	Anti-psicótico, anti-emético	0.847	1
Tioridazina	Anti-psicótico	0.840	14
Levamisol	Inmunoestimulante, anti-nemátodo	0.834	1(-)
Amiodarona	Anti-arritmico	0.801	17
Clofazimina	Antimicótico, anti-leproso	0.776	1
Pirimetamina	malaria, toxoplasma, isospora	0.774	1
Desipramina	Antidepresivo	0.758	1
Pentamidina	<i>T. brucei</i> , <i>Leishmania</i> spp <i>Pneumocystis carinii</i>	0.758	1
Carvedilol	Ag cardiovascular	0.739	1
Primaquina	Antimalárico	0.727	22
Miconazol	Antifúngico	0.723	6

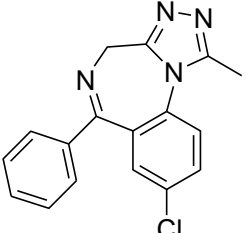
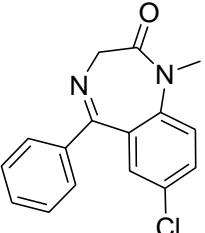
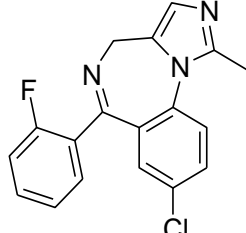
pMedia: promedio de las probabilidades de pertenecer a la clase activa según los tres modelos del ensamble; **REF:** Número de referencias en PubMed que describen la actividad del compuesto frente a *T. cruzi*. (Actualizado 12/Julio/2016)

____ Discusión ____

No existen referencias de la actividad de la quetiapina frente a *T. cruzi*; pero se contraindica su uso concomitante con fármacos que prolongan el intervalo-QT o en presencia de insuficiencia cardíaca congestiva e hipertrofia cardíaca, enfermedad cardiovascular, cerebrovascular u otras enfermedades que predispongan a hipotensión. Debido a las complicaciones cardíacas que usualmente acompañan a la enfermedad de Chagas, este compuesto, a pesar de su alta probabilidad de ser activo, fue excluido de la lista de productos priorizados para los ensayos biológicos.

De los restantes 43 compuestos clasificados como potencialmente activos por los modelos se hizo una selección teniendo en cuenta la novedad (considerando además compuestos estructuralmente similares) de la acción anti *T. cruzi*, la disponibilidad del compuesto, los efectos farmacológicos derivados de su indicación primaria, los efectos adversos (muy en particular los efectos sobre el corazón), la biodisponibilidad oral y las diferencias estructurales entre sí. Se concibió la evaluación *in vitro* de los 13 productos siguientes: alprazolam, atropina, carvedilol, ciproheptadina, clomifeno, cloranfenicol, dexclorfeniramina, domperidona, halofantrina, levomepromazina, meclozina, ondansetrón y ranitidina. Sin embargo, por falta de disponibilidad finalmente se probaron los siguientes cinco compuestos: ondansetrón, domperidona, alprazolam, ranitidina y atropina. Se probó además el diazepam y el midazolam, por su similitud con el alprazolam y, a pesar de estar predichos como inactivos frente a *T. cruzi* (**Tabla 19**). Como controles positivos se incluyó el nifurtimox y el benznidazol.

Tabla 19: Similitud estructural entre alprazolam, midazolam y diazepam

Nombre	Alprazolam	Diazepam	Midazolam
Estructura química			
pCruzi	0.7265	0.2055	0.4742
Tc	1.00	0.56	0.85

Tc: coeficiente de similitud de Tanimoto basado en farmacóforos con respecto al alprazolam

F2. Evaluación de actividad anti-leishmanial

F2.1 Ensayos *in vitro* vs. *Leishmania*

Curvas de crecimiento

Las tres cepas probadas mostraron un patrón de crecimiento similar (**Gráfico 2**); o sea, una fase de adaptación de menos de 24 h, una fase de crecimiento exponencial de aproximadamente tres días en el período de 24 a 96 h de instaurado el cultivo, una desaceleración desde las 96 hasta las 120 h, y una fase estacionaria que aparenta durar desde las 120 h hasta el séptimo día de cultivo. Basados en estos resultados se estableció una incubación de 72 h para la evaluación del efecto *in vitro* de los productos frente a los promastigotes de estas especies.

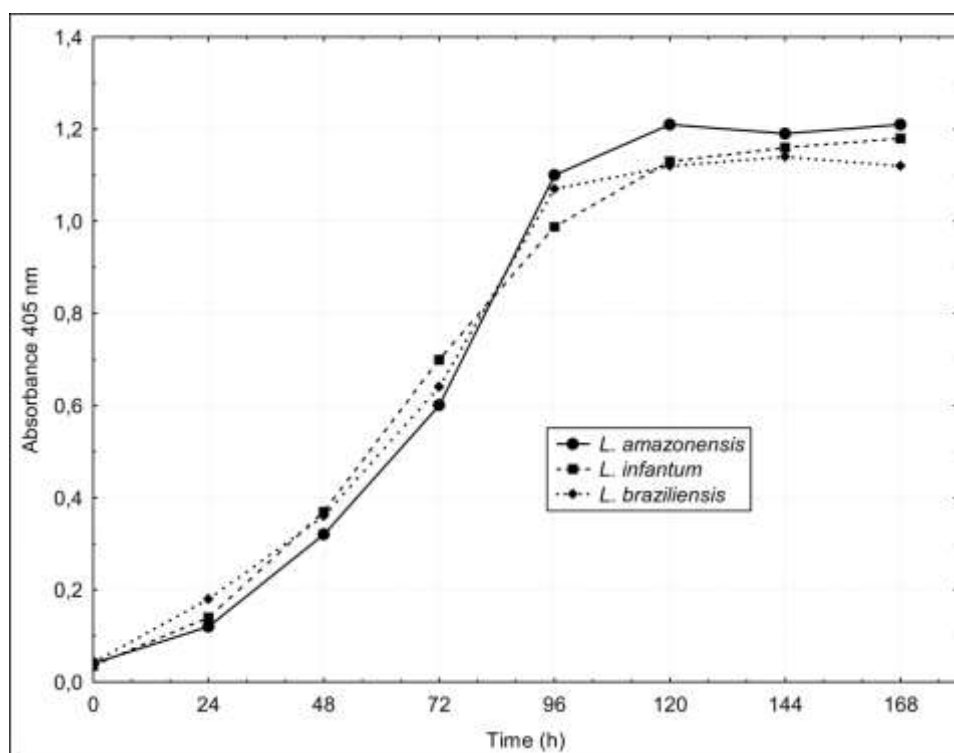


Gráfico 2: Curva de crecimiento de los promastigotes de las tres especies de *Leishmania*

Actividad anti-leishmanial *in vitro* y citotoxicidad

Se probaron finalmente 36 compuestos en el ensayo primario de actividad parasitocida frente a promastigotes de *L. amazonensis*. De ellos, 20 habían sido predichos como activos y los 16 restantes como inactivos. Ninguno de los compuestos teóricamente inactivos mostró actividad parasitocida a concentraciones inferiores a 250 µg/mL (**Tabla 20**). En cambio, de los 20 potencialmente activos según los modelos, **siete fueron parasitocidas a concentraciones inferiores a 10 µg/mL**, cuatro en el intervalo de 10-50 µg/mL y los nueve restantes no mostraron actividad a concentraciones inferiores a 50 µg/mL.

Tabla 20: Actividad parasitocida de compuestos probados frente a promastigotes de *L. amazonensis*

Nombre	Acción	pMax	CPM (µg/mL)
Natamicina	Antifúngico	0.9999	10-50
Atorvastatina	Anticolesterolémico	0.9999	>50
Meclozina	Antihistamínico	0.9998	4.4
Tioridazina	Anti-psicótico	0.9990	3.7
Clomifeno	Anti-estrógenos	0.9990	2.8
Doxorrubicina	Citostático	0.9990	250-500
Carvedilol	Agente cardiovascular	0.9975	6.3
Loratadina	Antihistamínico	0.9892	10-50
Haloperidol	Anti-psicótico	0.9792	10-50
Amikacina	Antibiótico	0.9754	>500
Papaverina	Antiespasmódico	0.9685	125-250
Furvina	Antimicrobiano	0.9620	1.5
Droperidol	Anti-psicótico	0.9503	8.4
Dobutamina	Simpaticomimético, inotrópico	0.9431	250-500
Toxoflavina	Antimicrobiano	0.9370	2.3

Midazolam	Hipnótico-sedante	0.9304	50-250
Difenhidramina	Antihistamínico	0.9231	>250
Camilofina	Antiespasmódico	0.8574	10-50
Dimenhidrinato	Antiemético	0.8145	50-125
Bupivacaina	Anestésico local	0.7687	>250
Atropina	Parasimpaticolítico	-0.7589	>250
Diazepam	Hipnótico, sedante	-0.7646	>250
Levamisol	Antihelmíntico	-0.9433	>500
Lidocaína	Anestésico local	-0.9635	>500
Metoclopramida	Antiemético, procinético	-0.9844	>500
Epinefrina	Vasoconstrictor	-0.9903	>500
Furosemida	Diurético	-0.9974	>500
Dipirona	Analgésico	-0.9977	>500
Nicetamida	Analéptico respiratorio, vasomotor	-0.9982	>500
Pilocarpina	Miótico, anti-glaucomatoso	-0.9983	>250
Ácido tranexámico	Anti-fibrinolítico	-0.9984	>500
Meropenem	Antibiótico	-0.9987	>250
Piperazina	Antinematódico	-0.9996	>500
Aminofilina	Broncodilatador	-0.9999	>500
Acetil cisteína	Mucolítico, antídoto	-1.0000	>500
Dinitrato de isosorbida	Vasodilatador	-1.0000	>500

pMax: probabilidad de ser activo según la fusión de tres modelos QSAR combinados por la probabilidad máxima.

De los siete compuestos que mostraron actividad parasitocida a concentraciones inferiores a 10 µg/mL (**Tabla 21**), cuatro (meclozina, tioridazina, furvina y toxoflavina) tuvieron además concentraciones inhibitorias medias inferiores a 1 µg/mL e índices de selectividad superiores a 15.

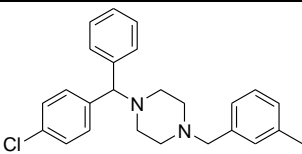
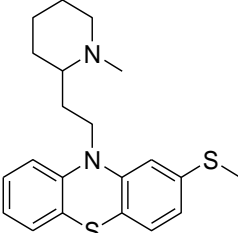
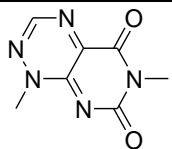
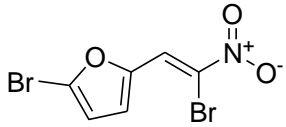
Tabla 21: Actividad inhibitoria frente a promastigotes de *L. amazonensis* y citotoxicidad en células KB

Compuesto	CI₅₀ (µg/mL)	CI₅₀ (µM)	CC₅₀ (µg/mL)	I.S.
Carvedilol	4.6±0.8	11.3±2.0	>30	>6
Clomifeno	1.7±0.2	4.2±0.5	13.4±0.8	12
Meclozina	0.88±0.2	2.3±0.5	21.6±1.2	25
Tioridazina	0.27±0.05	0.73±0.13	9.3±0.7	34
Droperidol	2.9±0.6	7.6±1.6	>30	>10
Furvina	0.23±0.04	0.77±0.13	4.1±0.9	18
Toxoflavina	0.75±0.1	3.9±0.5	14.2±0.4	19

La posterior evaluación de la actividad de estos cuatro compuestos contra amastigotes intracelulares (**Tabla 22**) demostró que la tioridazina fue la más activa, mostrando un valor de CE₅₀ inferior a 1 µg/mL y un índice de selectividad próximo a 20. La meclozina, a pesar de ser casi tres veces menos activa que la tioridazina (CE₅₀=3.6 µM vs. 1.3 µM), mostró un índice de selectividad similar a esta, debido a que fue menos tóxica para los macrófagos. La toxoflavina fue mucho menos activa frente a los amastigotes que contra los promastigotes, de ahí que finalmente mostrara un índice de selectividad bajo. Por su parte, la furvina mostró un perfil de actividad-citotoxicidad desfavorable, pues las concentraciones que no fueron citotóxicas tampoco fueron capaces de reducir notablemente la carga parasitaria en los macrófagos infectados, estimándose un bajo índice de selectividad.

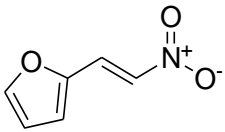
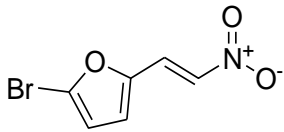
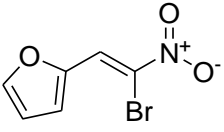
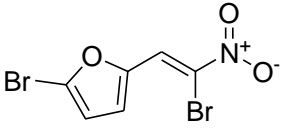
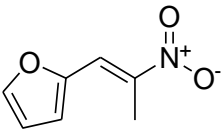
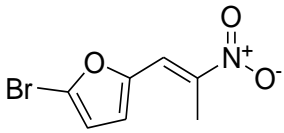
Según estos resultados se decidió avanzar con los estudios *in vivo* de la meclozina y la tioridazina. Asimismo, considerando la actividad mostrada por la furvina frente a promastigotes, su menor citotoxicidad descrita frente a otras líneas celulares,^[236] así como la existencia de otros cinco compuestos estructuralmente similares a esta, se decidió estudiar en mayor detalle el perfil de actividad-toxicidad en función de las modificaciones en la estructura química de estos compuestos.

Tabla 22: Actividad de compuestos selectos frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y citotoxicidad en macrófagos peritoneales de ratón

Compuesto	Estructura	CE ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µM)	CC ₅₀ (µg/mL)	I.S.
Meclozina		1.4±0.2	3.6±0.5	23.7±1.3	17
Tioridazina		0.47±0.1	1.3±0.3	8.9±0.7	19
Toxoflavina		4.2±0.3	21.7±0.6	12.3±0.4	2.9
Furvina		1.6±0.3	5.4±1.0	5.1±1.1	3.2

Los compuestos similares a la furvina constituyen una serie de derivados 2-nitrovinilfuránicos con cambios de sustituyentes en la posición 5 del anillo furánico y en el carbono 2 del doble enlace exocíclico (**Tabla 23**).

Tabla 23: Estructura de los derivados 2-nitrovinilfuránicos (similares a la furvina)

Cadena\Anillo	Hidrógeno	Bromo
Hidrógeno	 G0	 MbA
Bromo	 MbC	 Furvina
Metilo	 UC244	 UC245

Los seis derivados 2-nitrovinilfuránicos inhibieron el crecimiento de los promastigotes (**Tabla 24**) de *L. amazonensis*, por lo que se decidió evaluar su actividad frente a promastigotes de otras dos especies (*L. infantum* y *L. braziliensis*). La susceptibilidad mostrada por las tres especies de *Leishmania* fue comparable (análisis de varianza, $p=0.086$), con valores de CI_{50} en el rango de 0.18 a 0.66 $\mu\text{g/mL}$ (0.82-4.7 μM). A concentraciones superiores (1.7-32 μM) los compuestos también mostraron un efecto parasitocida, lo cual se evidenció por la inmovilidad total y la destrucción de los promastigotes luego de 2-3 h de exposición. La anfotericina B, usada como control positivo, mostró valores de CI_{50} de 0.015-0.030 μM .

Tabla 24: Actividad *in vitro* frente a promastigotes de tres especies de Leishmania y citotoxicidad de los derivados 2-nitrovinilfuránicos*

Compuesto	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. infantum</i>		Media	Células KB	IS
	Cl ₅₀	CPM	Cl ₅₀	CPM	Cl ₅₀	CPM	Cl ₅₀	CC ₅₀	
G0	4.7±0.4	8.1±0.4	1.4±0.3	9.3±0.4	2.5±0.4	12.6±0.5	2.87	11.6±3.6	4
MbA	2.1±0.3	9.5±0.4	0.8±0.3	2.8±0.4	1.1±0.3	2.3±0.5	1.33	6.0±2.6	5
MbC	2.9±0.3	8.1±0.4	1.1±0.4	5.7±0.4	1.7±0.2	9.2±0.3	1.90	16.6±3.8	9
Furvina	0.8±0.3	5.2±0.4	0.9±0.4	1.7±0.4	1.2±0.3	2.9±0.3	0.97	13.6±2.2	14
UC244	2.2±0.4	22.8±0.9	2.3±0.2	31.6±0.5	2.0±0.2	8.3±0.5	2.17	25.4±3.8	12
UC245	0.9±0.2	6.1±0.4	1.0±0.3	5.7±0.4	0.9±0.3	2.7±0.4	0.93	16.7±1.8	18
AmB	29±5	55±7	14±3	30±6	14±4	17±5	-	-	-

*Los valores de Cl₅₀, CPM y CC₅₀ están expresados en µM, excepto para la anfotericina B que están expresados en nM.

La densidad electrónica en el carbono 1 (C1), al igual que la polaridad del doble enlace exocíclico de los derivados 2-nitrovinilfuránicos, se incrementan con la sustitución del hidrógeno por bromo en el anillo furánico (**Tabla 25**) o por metilo o bromo en el carbono 2 (C2) de la cadena vinílica (**Tablas 26 y 27**). Estos cambios estructurales también estuvieron asociados con un aumento de la actividad anti-leishmanial. La comparación por pares de los compuestos que solo difieren en la presencia de bromo en el anillo furánico (G0 vs. MbA, MbC vs. Furvina y UC244 vs. UC245) evidenció una disminución de las cargas de Mulliken en C1 en el rango de 0.004-0.005 para los compuestos bromados, la cual coincidió con un aumento de la polaridad del doble y un incremento en la actividad inhibitoria frente a los promastigotes.

De modo similar, la metilación (G0 vs. UC244 y MbA vs. UC245) o la bromación en C2 (G0 vs. MbC y MbA vs. furvina) provocaron una reducción de las cargas de Mulliken en

____ Discusión ____

C1 de 0.009 y 0.0047, respectivamente; la cual también estuvo asociada con un aumento de la actividad anti-leishmanial.

Tabla 25: Efecto de la bromación en el anillo en las densidades electrónicas y la actividad inhibitoria frente a promastigotes de *L. amazonensis*

Compuesto	C1	C2	Diferencia	Cl ₅₀
G0	-0.104	0.053	0.157	2.87
MbA	-0.108	0.053	0.161	1.33
MbC	-0.113	0.170	0.283	1.90
G1	-0.117	0.169	0.286	0.97
UC244	-0.146	0.226	0.372	2.17
UC245	-0.151	0.226	0.377	0.93

Tabla 26: Efecto de la bromación en la cadena en las densidades electrónicas y la actividad inhibitoria frente a promastigotes de *L. amazonensis*

Compuesto	C1	C2	Diferencia	Cl ₅₀
G0	-0.104	0.053	0.157	2.87
MbC	-0.113	0.170	0.283	1.90
MbA	-0.108	0.053	0.161	1.33
G1	-0.117	0.169	0.286	0.97

Tabla 27: Efecto de la metilación en la cadena en las densidades electrónicas y la actividad inhibitoria frente a promastigotes de *L. amazonensis*

Compuesto	C1	C2	Diferencia	Cl ₅₀
G0	-0.104	0.053	0.157	2.87
UC244	-0.146	0.226	0.372	2.17
MbA	-0.108	0.053	0.161	1.33
UC245	-0.151	0.226	0.377	0.93

Las células HeLa-KB fueron sensibles a la podofilotoxina (control positivo de citotoxicidad), con una CC_{50} de 5.3 ± 1.4 nM. Las CC_{50} para los seis compuestos en ensayo estuvieron en el rango de 6-25 μ M (**Tabla 24**). Sin embargo, no existió una correlación significativa (Coeficiente de correlación por rangos de Spearman $R = -0.086$, $p > 0.05$) entre los valores de CC_{50} y CI_{50} (**Gráfico 3**). Los índices de selectividad calculados sobre la base de la actividad frente a los promastigotes y la citotoxicidad en células KB fueron de 4-18, correspondiendo los valores más altos al UC245 y la furvina (**Tabla 24**).

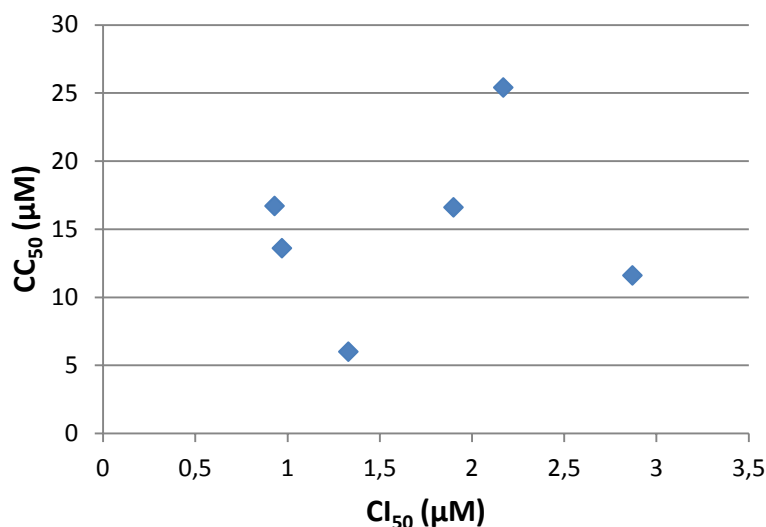


Gráfico 3: Análisis de correlación entre la actividad anti-leishmanial y la citotoxicidad de los derivados 2-nitrovinilfuránicos

Nuevamente, al evaluar la citotoxicidad de estos otros cinco derivados 2-nitrovinilfuránicos frente a macrófagos peritoneales de ratón y probar la actividad antiparasitaria en macrófagos infectados por amastigotes de *L. amazonensis* tampoco fue posible alcanzar niveles adecuados de actividad al emplear concentraciones no citotóxicas de los productos.

F2.2. Ensayos *in vivo* vs. *Leishmania*

Se realizó un primer estudio de actividad con la dosis máxima tolerada, o sea, aquella dosis que no causa muertes ni pérdidas de peso superiores al 10% con respecto al

peso inicial y con una dosis equivalente a la mitad de la DMT. En caso de mostrar actividad en algunas de estas dosis, se realizaron estudios a dosis inferiores, de lo contrario, el compuesto se consideró inactivo *in vivo* y no se llevaron a cabo nuevos estudios con él. Para llegar a la dosis máxima tolerada se buscó información preclínica sobre los productos. Además, se realizaron estudios pilotos en el modelo animal utilizado (ratones Balb/c, hembras, de 18-20 g, vía intraperitoneal, administración diaria durante 14 días consecutivos) que no se detallan en el presente documento porque consideramos que se apartan del tema central de la tesis. No obstante, en la **Tabla 28** resumimos los resultados más relevantes a los efectos del presente trabajo.

Tabla 28: Dosis máximas toleradas de los compuestos seleccionados para ensayos *in vivo*

Compuesto	DMT (mg/kg)	Frecuencia (h ⁻¹)
Meclozina	>200	24
Tioridazina	50	24
Furvina	5	24
	2	12
UC245	100	24
	100	12

Cabe señalar que la tioridazina requirió una adaptación de, al menos, cuatro días en los que se fue incrementando la dosis. Esto debido a que dosis altas de tioridazina sin previa adaptación provocaron una sedación letal en los ratones. A los niveles de la DMT aún se manifestó sedación profunda, pero al siguiente día de las administraciones los ratones ya se habían recuperado completamente y al final de los 14 días de tratamiento no mostraron pérdidas de peso ni síntomas tóxicos aparentes.

Tratamiento experimental con Meclozina, Tioridazina y Furvina

Las lesiones de los ratones infectados experimentalmente con *L. amazonensis* y que fueron tratados con meclozina (**Gráfico 4**) a dosis de 50 y 100 mg/kg durante 14 días

mostraron un desarrollo similar ($p=0.35$ y $p=0.66$, respectivamente) al de los ratones controles (infectados no tratados). Tampoco mostraron un efecto apreciable el Mygliol-810 ($p=0.91$) y la solución salina fisiológica ($p=0.31$) empleados como vehículos de los compuestos de prueba.

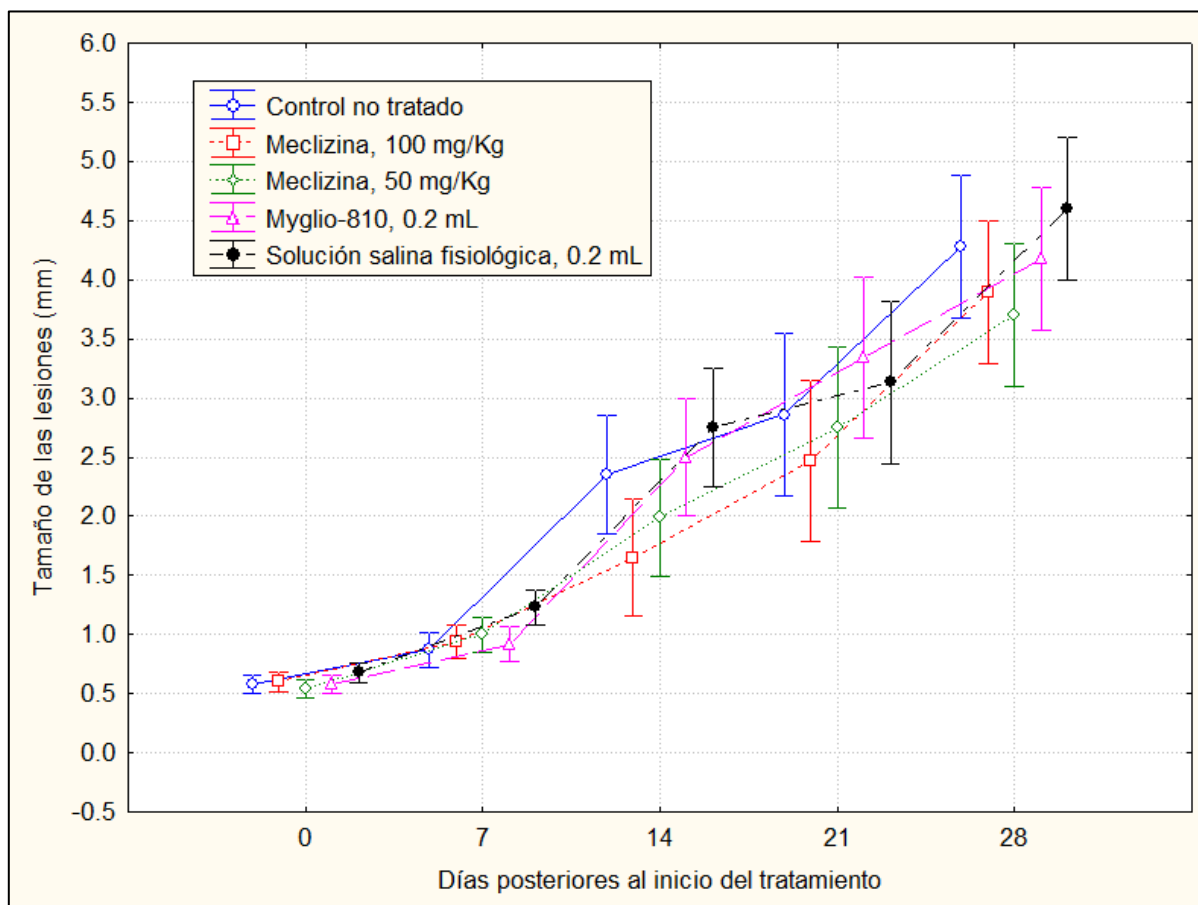


Gráfico 4: Actividad anti-leishmanial *in vivo* de la meclozina y los solventes empleados durante el ensayo (Medias e intervalos de confianza 95%)

La anfotericina B a 1 mg/kg empleada como control positivo mostró un efecto significativo ($p<0.05$), a juzgar por la reducción del crecimiento de las lesiones en comparación al grupo control no tratado (**Gráfico 5**). Este efecto solo fue evidente a partir de la segunda semana de tratamiento, aunque se mantuvo durante las dos semanas de seguimiento posteriores a la retirada del medicamento.

Las lesiones de los ratones tratados con furvina a 5 mg/kg también mostraron un efecto terapéutico significativo ($p<0.001$) con respecto al grupo control, el cual fue evidente

Discusión

desde la primera semana ($p= 0.045$) de instaurado el tratamiento. Además, las lesiones de estos ratones además tuvieron menor crecimiento ($p<0.0078$) que las de los tratados con anfotericina B durante las dos semanas de tratamiento. En lo adelante, ambos grupos mostraron un comportamiento similar ($p>0.1$). Por el contrario, a la dosis de 2.5 mg/kg la actividad de la furvina fue menos notable, diferenciándose ($p=0.0050$) del grupo control únicamente en la evaluación correspondiente a la culminación del tratamiento.

La tioridazina mostró similares resultados a las dosis de 50 y 25 mg/kg ($p=0.68$) en cuanto al tamaño de las lesiones se refiere, diferenciándose significativamente tanto de los controles no tratados ($p<0.001$), como de los controles positivos tratados con anfotericina B ($p<0.01$).

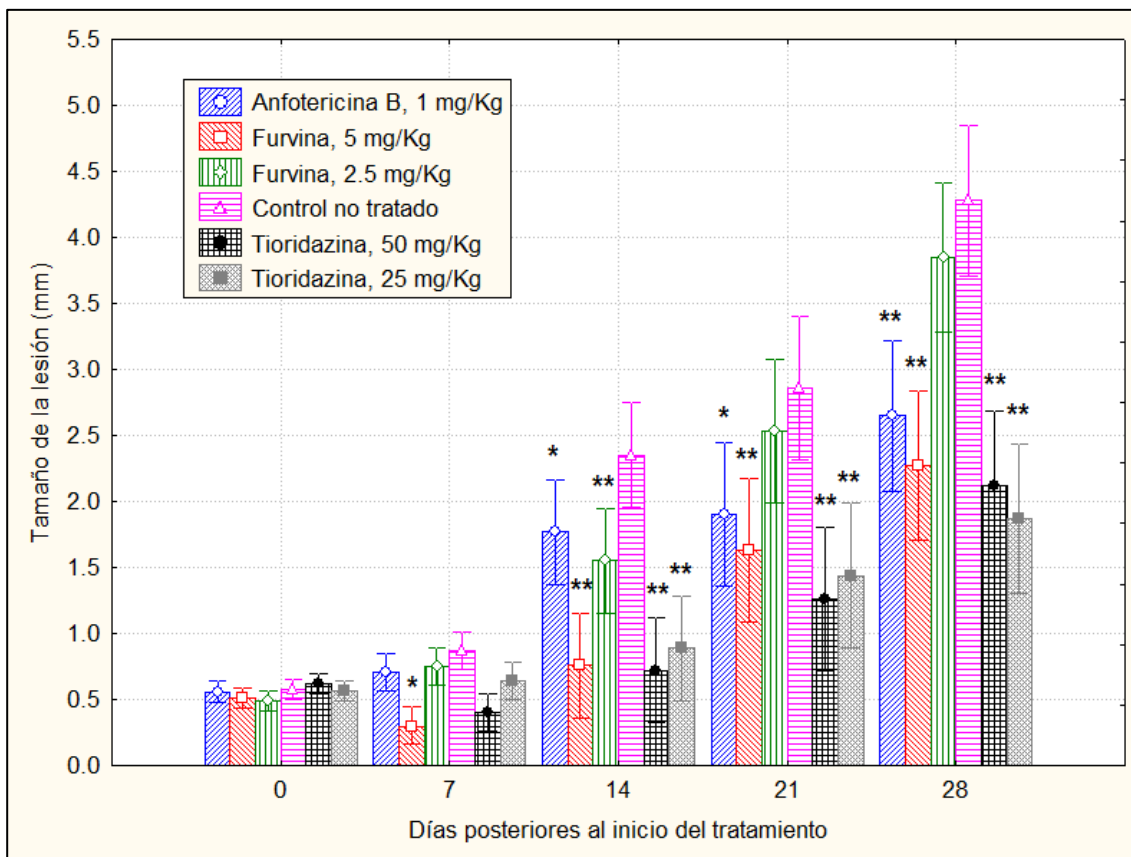


Gráfico 5: Actividad anti-leishmanial de la furvina y la tioridazina frente a la leishmaniosis cutánea experimental (Medias e intervalos de confianza 95%). *: Diferencias respecto al grupo control a $p<0.05$ y **, a $p<0.01$ según ANOVA y prueba de Dunnett

La evolución del tamaño de las lesiones estuvo en correspondencia con la carga de parásitos presentes en los tejidos de la lesión (**Gráfico 6**) al concluir el período de seguimiento (14 días luego de terminado el tratamiento). Pudo comprobarse una menor cantidad de parásitos por gramo de tejido lesional ($p < 0.05$) en los ratones tratados con furvina a 5 mg/kg, tioridazina (25 y 50 mg/kg) y anfotericina B con respecto a los controles no tratados. Sin embargo, aquellos tratados con meclozina (100 y 50 mg/kg) o furvina a 2.5 mg/kg no evidenciaron una reducción significativa ($p > 0.1$) de la carga parasitaria.

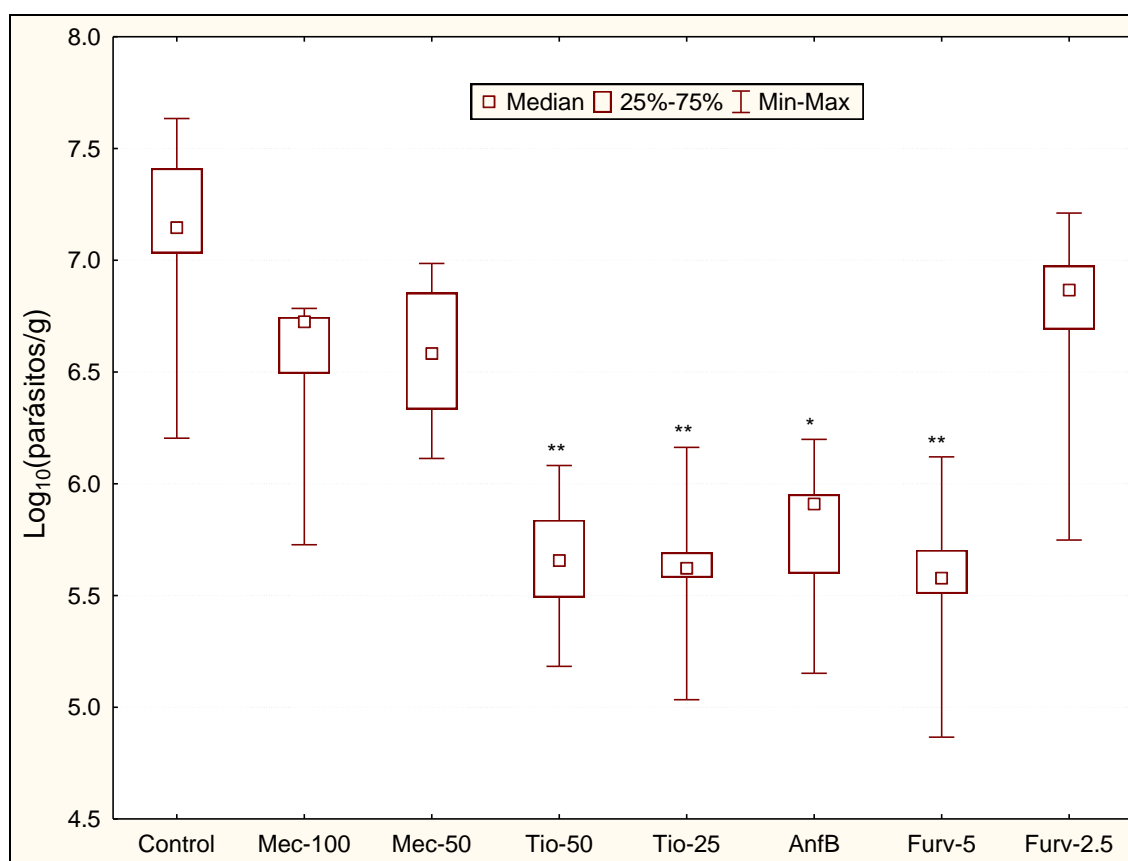


Gráfico 6: Carga parasitaria en las lesiones al culminar el período de seguimiento. Los grupos marcados con * y ** difieren del grupo control a $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente, según prueba de Kruskal-Wallis y prueba de comparaciones múltiples para distribuciones libres.

Estudio comparativo de la actividad anti-leishmanial *in vivo* de la furvina y el UC245

En el ensayo anterior se demostró la actividad *in vivo* de la furvina a 5 mg/kg por administración diaria, vía intraperitoneal y durante dos semanas. El UC245 resultó de los compuestos estructuralmente similares a la furvina, el de mejor índice de selectividad *in vitro* y mostró además una toxicidad *in vivo* sustancialmente menor que el resto de los derivados 2-nitronilfuránicos. Es por ello que se decidió evaluar, de forma comparativa, la actividad de ambos compuestos.

Una vez que los ratones manifestaron las lesiones, se inició el tratamiento diario con furvina (5 mg/kg) o UC245 (100 mg/kg). Durante las dos semanas de tratamiento y las otras dos de seguimiento, el tamaño de las lesiones de los ratones tratados con furvina o con UC245 fueron estadísticamente inferiores ($p < 0.01$) a las de los ratones del grupo control no tratado. Las lesiones de los ratones tratados mostraron un crecimiento mínimo durante la primera semana (**Gráfico 7**) y en particular, las lesiones de aquellos tratados con UC245 mostraron un ligero decrecimiento. A lo largo del experimento las lesiones de los ratones tratados con furvina o UC245 mostraron un crecimiento similar ($p = 0.37$) e inferior al de las lesiones de los ratones tratados con anfotericina B ($p < 0.01$); diferencias que se acrecentaron con el transcurso del tiempo. Los ratones tratados con anfotericina B mostraron lesiones de un tamaño estadísticamente menor al de los controles ($p < 0.01$), aunque solo durante las dos semanas posteriores a la culminación del tratamiento.

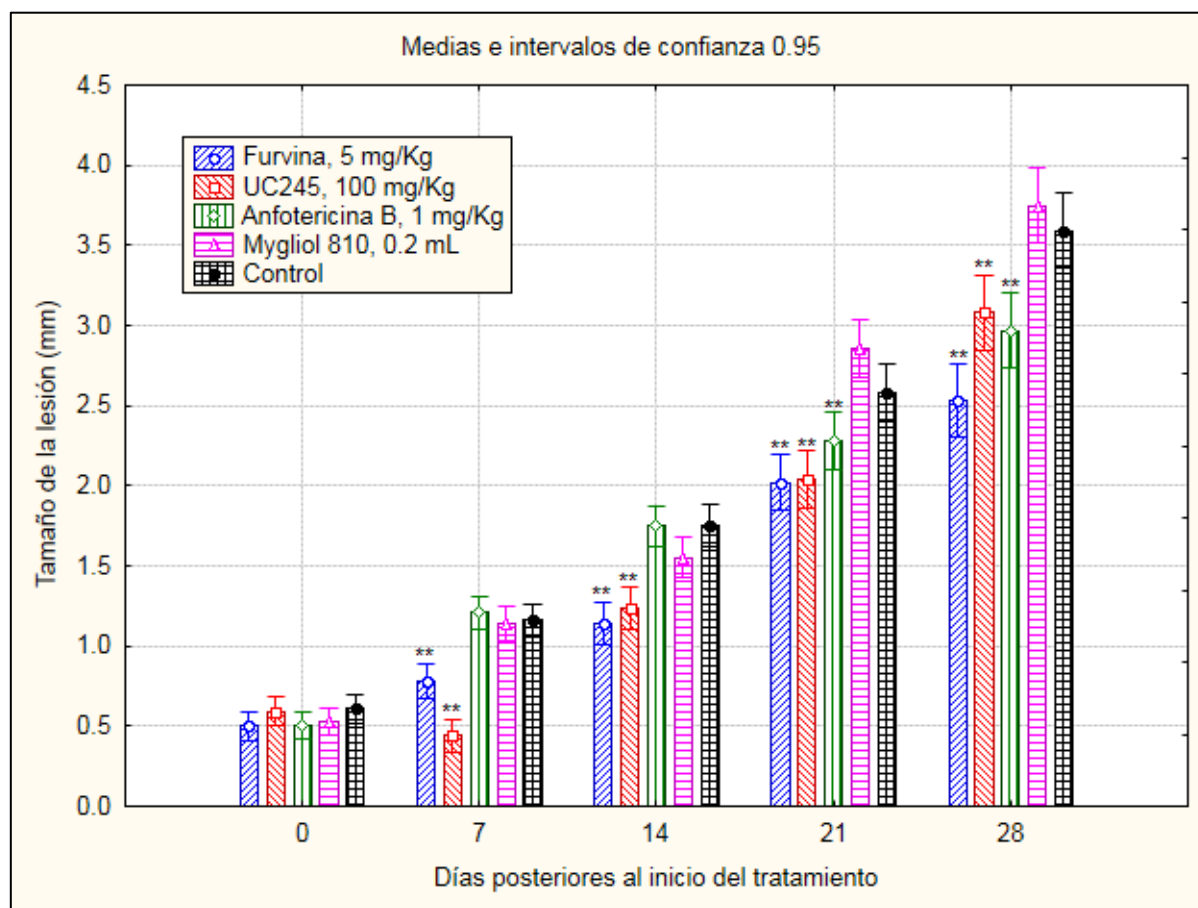


Gráfico 7: Efectividad de la furvina y el UC245 frente a la leishmaniosis cutánea experimental. **: Diferencias con respecto al control no tratado ($p < 0.05$) según análisis de varianza de mediciones repetidas y prueba de Dunnett.

Estudio comparativo de la Furvina y el UC245 en régimen de administración cada 12h

Al acortar el intervalo de administración de 24 a 12h se obtuvieron resultados comparables (**Gráfico 8**) a los obtenidos en el experimento anterior, ya que tanto la furvina como el UC245 retardaron el crecimiento de las lesiones en comparación al grupo control ($p < 0.01$), los dos compuestos mostraron similar actividad ($p > 0.05$) y su efecto fue ligeramente superior al logrado por la anfotericina B ($p < 0.05$). No obstante, en este caso la actividad, medida por las diferencias entre los grupos tratados con furvina o UC245 con respecto al grupo control, fue mayor.

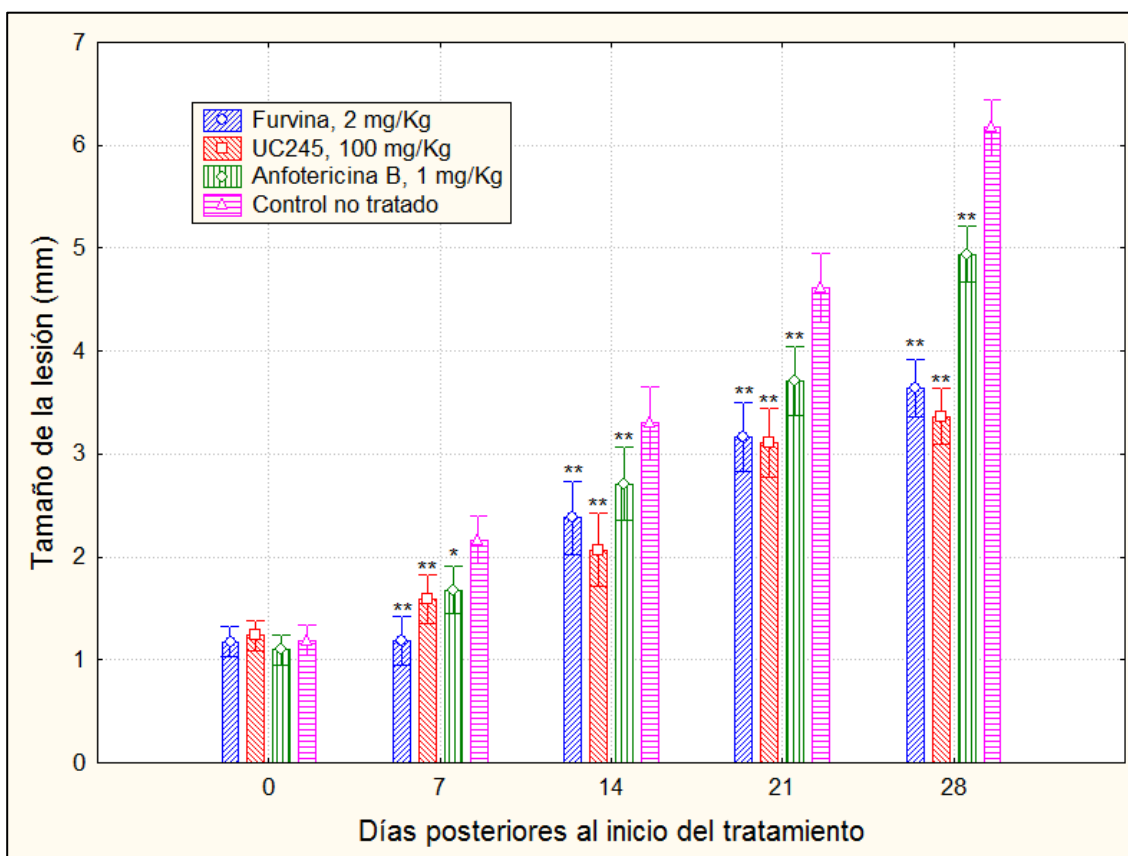


Gráfico 8: Actividad de la furvina y el UC245 por administración cada 12h. **: Diferencias con respecto al control no tratado ($p < 0.05$) según análisis de varianza de mediciones repetidas y prueba de Dunnett.

Actividad de la furvina y el UC245 frente a la leishmaniosis cutánea avanzada

En este experimento los ratones habían desarrollado lesiones crónicas al cabo de 18 semanas post-infección. Estas se encontraban ulceradas y cubiertas plantarmente por una gruesa costra. El diámetro dorso-plantar era de 1.23 ± 0.24 cm y el latero-medial, de 1.24 ± 0.19 cm. En este estadio de evolución se inició el tratamiento con los 2-nitrovinilfuranos o la anfotericina B. Los ratones tratados con furvina evidenciaron una disminución progresiva de las lesiones, diferenciándose estadísticamente del resto de los grupos ($p < 0.01$), incluyendo el tratado con anfotericina B (**Gráfico 9**). Por el contrario, el UC245 no mostró efecto alguno.

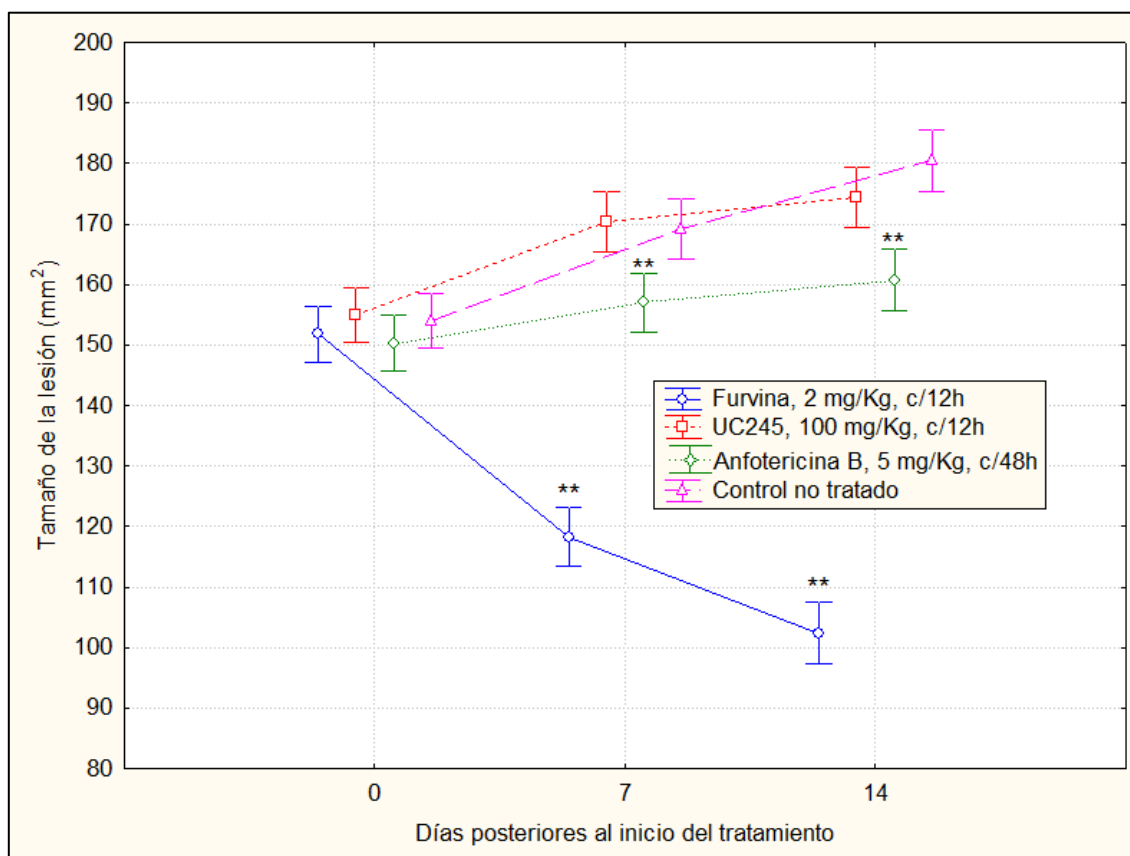


Gráfico 9: Actividad de la furvina y el UC245 frente a lesiones avanzadas de leishmaniosis cutánea. **: Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) respecto al grupo control según análisis de varianza para mediciones repetidas y prueba de Dunnett.

Estudio de dosis-efecto de la tioridazina y la anfotericina B frente a la leishmaniosis cutánea experimental

Considerando que la tioridazina fue igualmente activa a 50 y 25 mg/kg se realizó un segundo ensayo con este compuesto a dosis desde 5 hasta 25 mg/kg. Pudo comprobarse (**Gráfico 10**) que durante las dos semanas de tratamiento y las dos de seguimiento posteriores a la culminación de la terapia, las lesiones de los ratones tratados con dosis de 15, 20 y 25 mg/kg mostraron un crecimiento inferior ($p < 0.01$) a las de los ratones no tratados. Es de notar que el efecto del tratamiento con tioridazina se hizo evidente más rápido que el de la anfotericina B, el cual fue significativo solo a partir de la segunda semana de tratamiento.

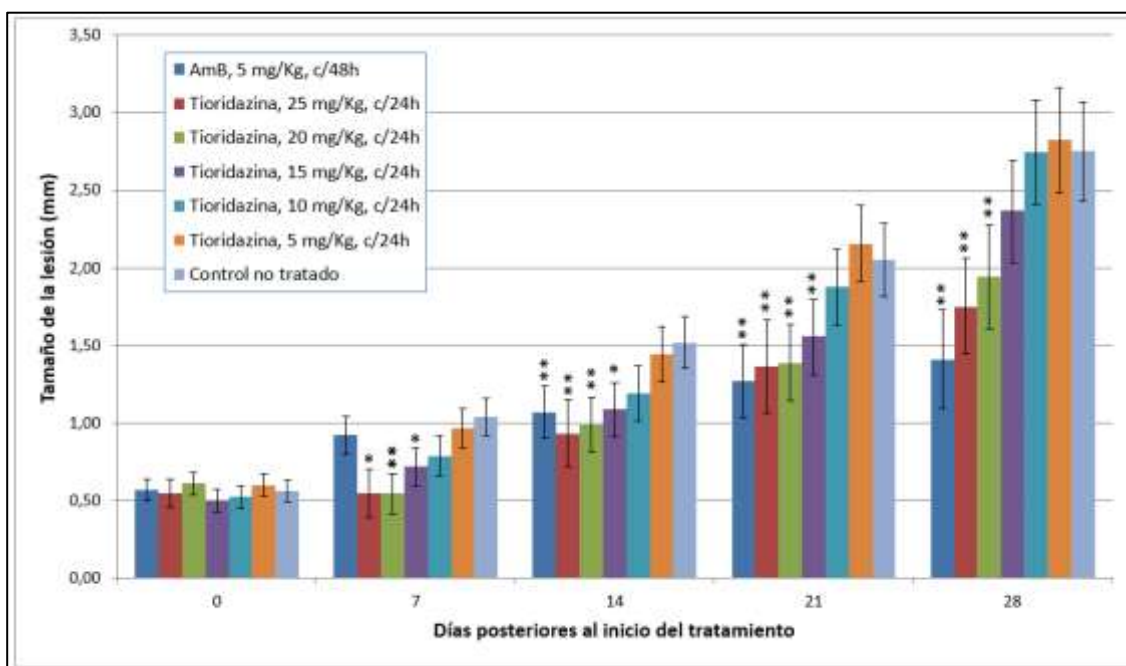


Gráfico 10: Estudio de dosis-efecto de la tioridazina frente a la leishmaniosis cutánea experimental. **: Diferencias estadísticamente significativas ($p<0.01$) respecto al grupo control según análisis de varianza para mediciones repetidas y prueba de Dunnett.

En paralelo al estudio de dosis-efecto de la tioridazina se realizó uno similar con la anfotericina B; pero a dosis entre 5 y 12.5 mg/kg y administrándola a intervalos de 48 h. Pudo comprobarse que a estas dosis la anfotericina B redujo marcadamente el crecimiento de las lesiones (**Gráfico 11**). Si bien a 5 mg/kg se retardó significativamente ($p<0.001$) el crecimiento de las lesiones con respecto al grupo control, en ningún momento se manifestó reducción del tamaño de estas. Sin embargo, a partir de 7.5 mg/kg se produjo un decrecimiento de las lesiones proporcional a la dosis de anfotericina B. Esta reducción de las lesiones se extendió hasta aproximadamente tres semanas luego de concluido el tratamiento con las dosis de 7.5 y 10 mg/kg, momento a partir del cual crecieron nuevamente. En cambio, con la dosis máxima probada (12.5 mg/kg) las lesiones se redujeron a un tamaño mínimo y permanecieron así hasta las 6-7 semanas después de concluido el tratamiento. A partir de entonces se observó una recaída en siete de los 9 ratones sobrevivientes hasta esa fecha, siendo evidente que ninguna de las dosis fue capaz de curar definitivamente.

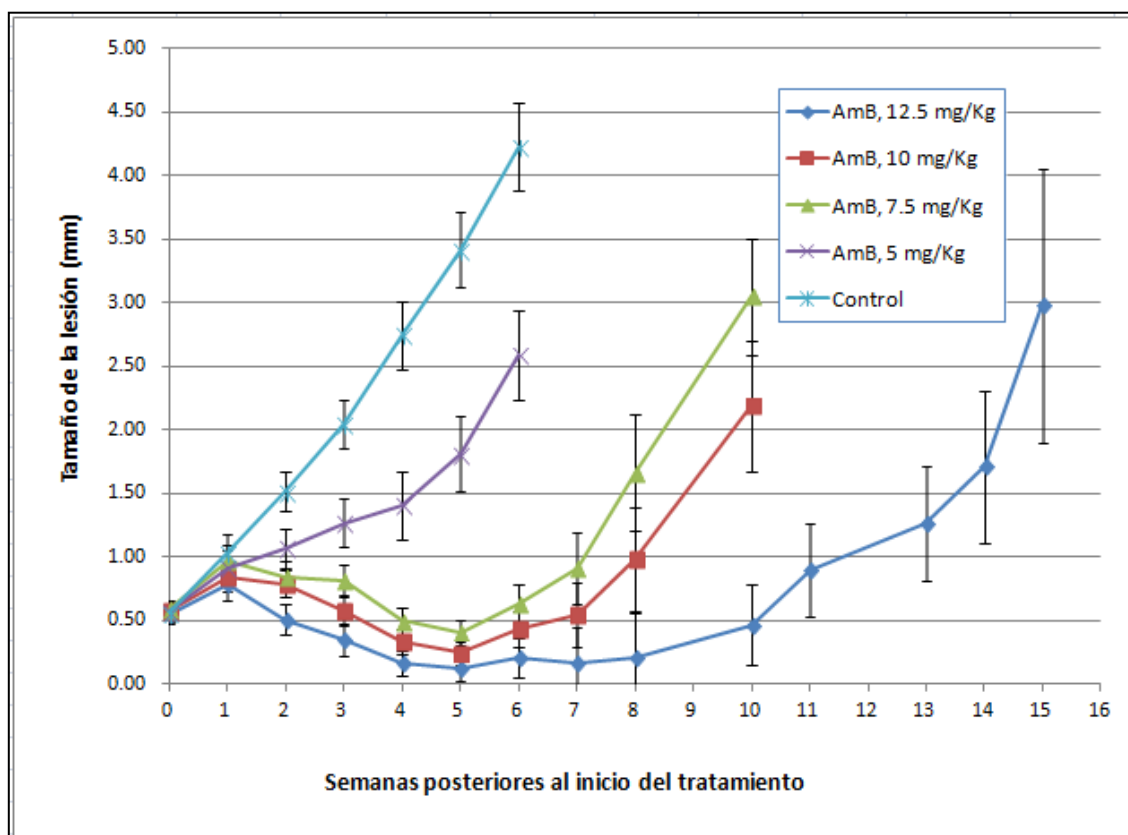


Gráfico 11: Dosis-efecto de la anfotericina B en el modelo de leishmaniosis cutánea por *L. amazonensis* en ratones Balb/c. [Todos los tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control ($p < 0.01$) luego de la segunda semana de iniciada la terapia]

Se calculó la eficacia de la anfotericina B en el modelo animal sobre la base del tamaño de las lesiones de los ratones tratados con relación a los controles al cabo de cinco semanas posteriores al inicio del tratamiento que fue donde se observó el máximo efecto terapéutico (**Gráfico 12**). Pudo comprobarse que con dosis a partir de 7.5 mg/kg se logró cerca de un 90% de eficacia.

Las pérdidas de peso estuvieron dentro de márgenes aceptables en el rango de 5-10 mg/kg, si bien con la dosis de 12.5 mg/kg aún estas no llegaron al 10% del peso de los ratones antes de iniciar el tratamiento. Haciendo un análisis combinado de estas dos variables, tomadas como indicadores de eficacia y seguridad, proponemos que se emplee en futuros ensayos dosis de 7.5 a 10 mg/kg.

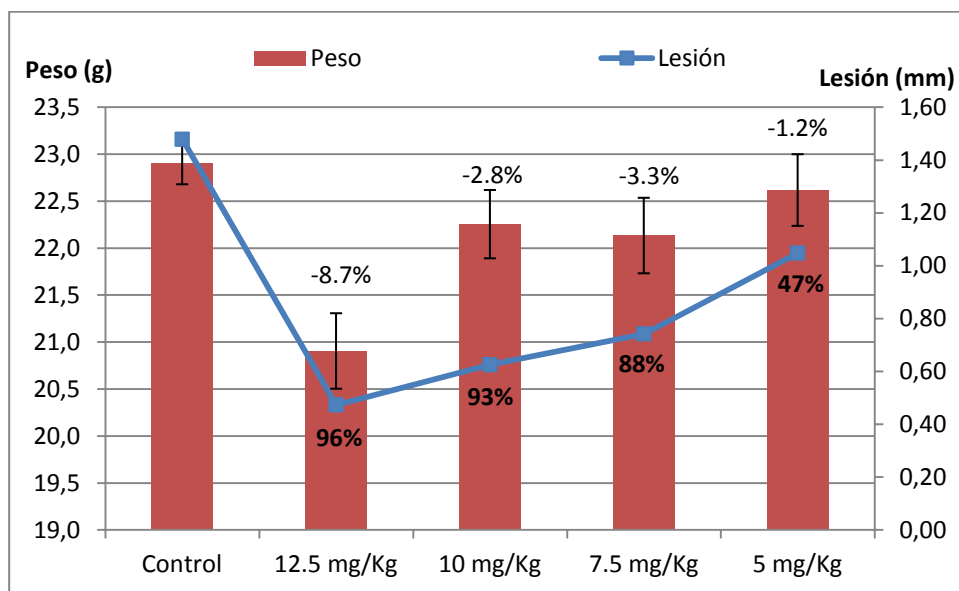


Gráfico 12: Eficacia y pérdidas de peso asociadas al tratamiento con anfotericina B a distintos niveles de dosis. Los rótulos en negritas se refieren al porcentaje de eficacia con relación al tamaño de las lesiones y los rótulos en texto simple a las pérdidas de peso con respecto al grupo control.

F3. Actividad *in vitro* frente a *T. cruzi*

Se evaluó la inhibición de la proliferación intracelular de los amastigotes de *T. cruzi* enfrentando los cultivos a los productos a una concentración de 10 μM (**Gráfico 13**). En comparación con la actividad del nifurtimox, el efecto inhibitorio de los productos probados fue despreciable, con la excepción del alprazolam que mostró aproximadamente un 85% de actividad relativa. La CI_{50} estimada del alprazolam frente a los amastigotes intracelulares fue de $5.3 \pm 1.4 \mu\text{M}$, mientras que la del benznidazol fue de $3.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$.

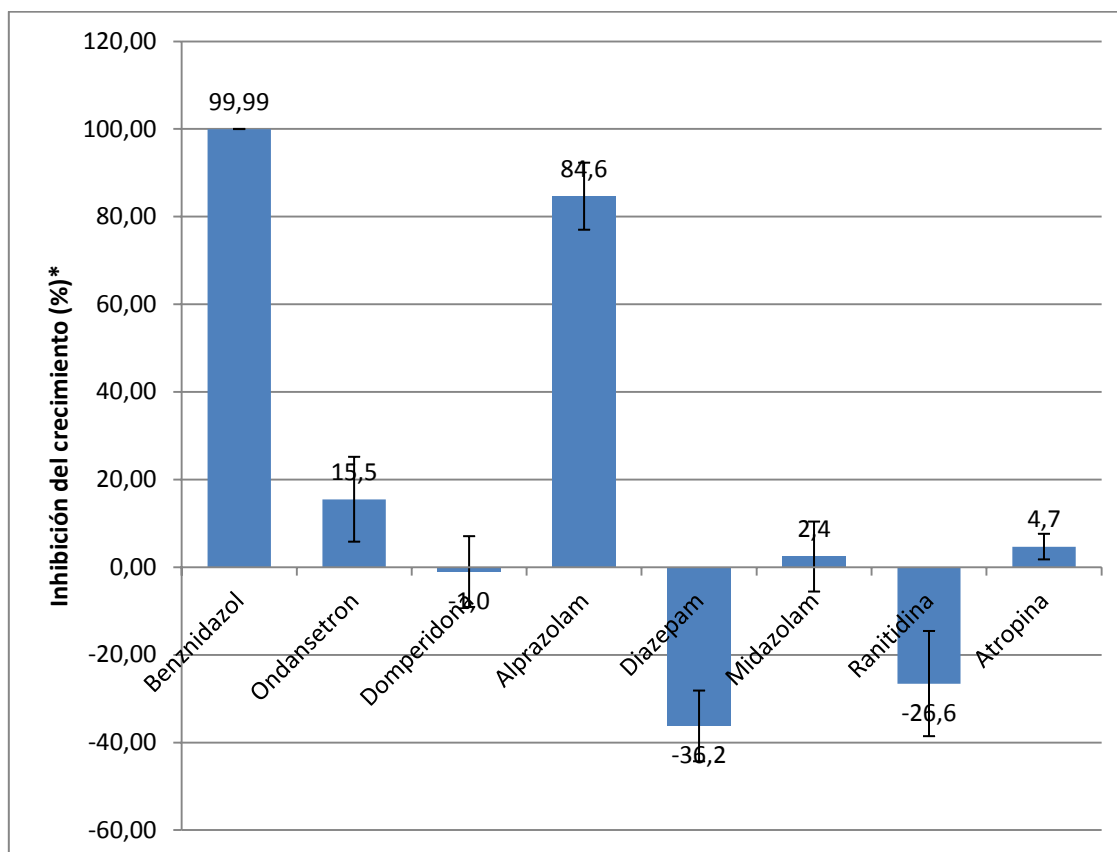


Gráfico 13: Inhibición de la multiplicación de los amastigotes intracelulares de *T. cruzi*.

*Los valores de inhibición del crecimiento son relativos al crecimiento de los cultivos no tratados (controles negativos) y a los tratados con nifurtimox (control positivo).

A 10 μM la citotoxicidad de los productos también fue baja, (**Gráfico 14**) nuevamente con la excepción del alprazolam que mostró una inhibición de la viabilidad celular del 35% aproximadamente con respecto a los cultivos celulares no tratados (controles negativos). La concentración citotóxica media estimada del alprazolam fue de $18.2 \pm 1.8 \mu\text{M}$.

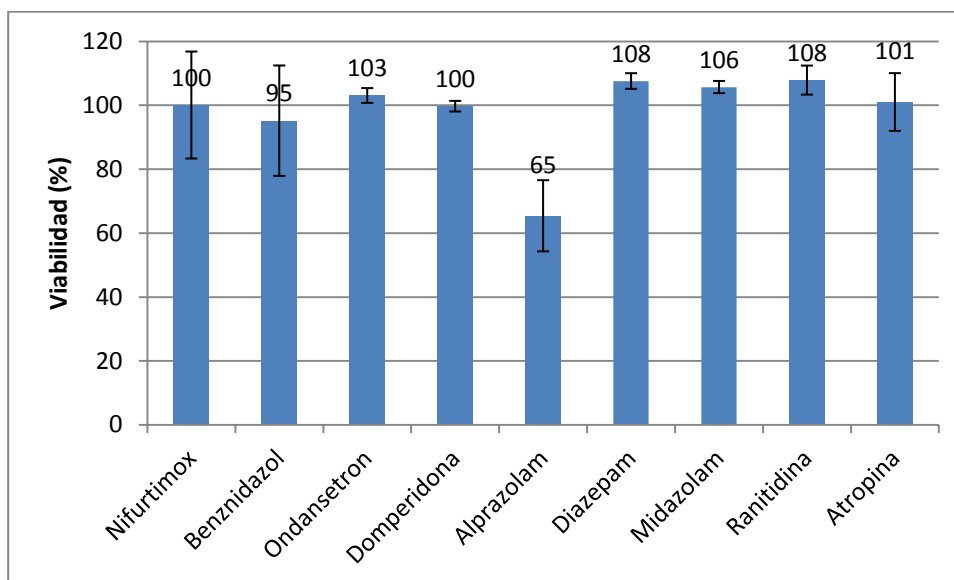


Gráfico 14: Citotoxicidad de los productos en las células hospederas

Sobre la base de los resultados de actividad inhibitoria frente a los amastigotes y la citotoxicidad para las células hospederas se calculó un índice de selectividad para el alprazolam de 3.4.

F4. Actividad cruzada de compuestos anti-leishmaniales y anti-chagásicos

Las frecuencias de las probabilidades calculadas por el multclasificador de actividad anti-leishmanial (**Gráfico 15**, Panel A) mostraron una distribución bimodal, con franco predominio de los valores extremos. En cambio, el ensamble para la clasificación de la actividad anti-*T. cruzi* produjo valores de probabilidades (**Gráfico 15**, Panel D) con una distribución asimétrica (coeficiente de asimetría igual a 0.51), con predominio de los valores bajos, aunque distribuidos a todo lo largo del intervalo 0-1. Por estas características de las distribuciones de frecuencias no fue posible analizar las correlaciones por métodos paramétricos pues no cumplen el supuesto de normalidad bivariada. Consiguientemente, se acudió al análisis no paramétrico basado en el coeficiente de correlaciones por rangos de Spearman.

Se observó una correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el ordenamiento de las probabilidades de los modelos de predicción de anti-leishmaniales y anti-chagásicos. No obstante, el grado de asociación entre ambas variables fue bajo

(Coeficiente de correlación por rangos de Spearman $\rho = 0.17$). Esto significa que **el orden** de los valores de probabilidad de los distintos compuestos tiene una **tendencia** (estadísticamente significativa) a seguir un patrón similar en ambos sistemas de modelos. Sin embargo, los valores de probabilidad para un mismo compuesto no son necesariamente similares. Por consiguiente, un compuesto identificado como potencialmente activo para una enfermedad, pudo haber sido clasificado como inactivo para la otra.

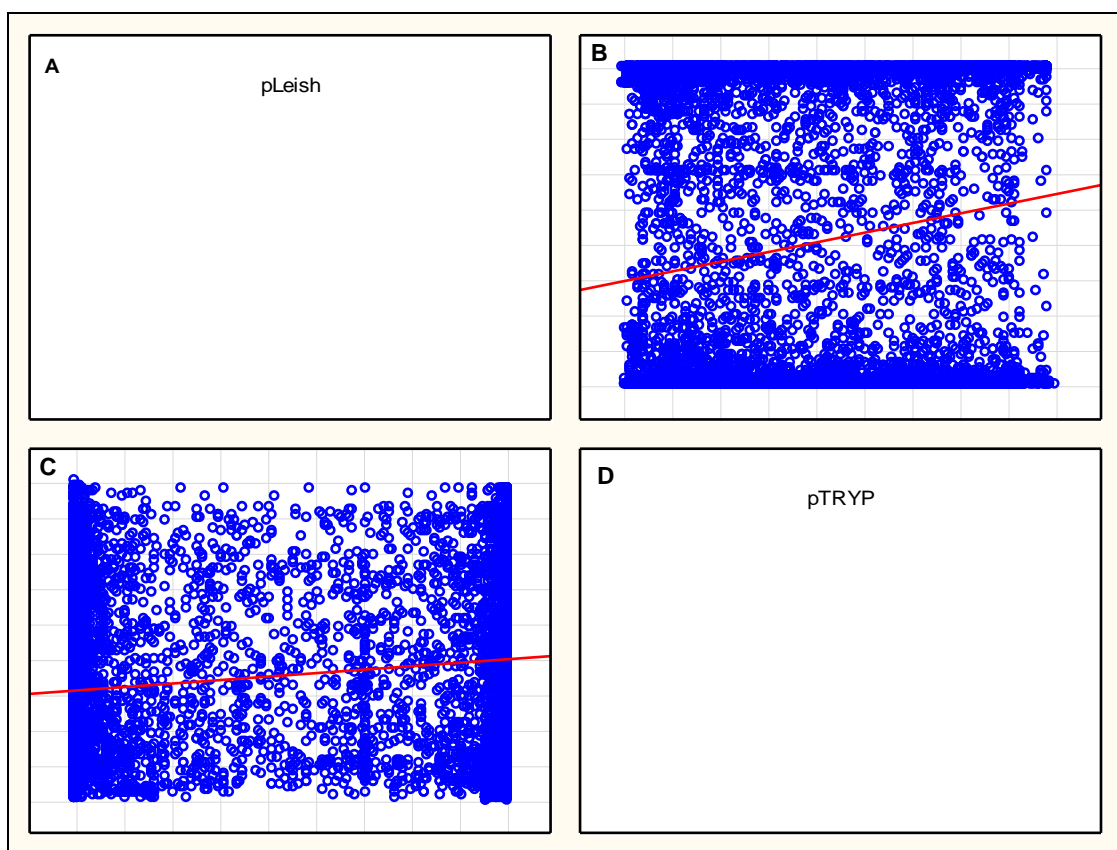


Gráfico 15: Correlación entre las probabilidades de los modelos de predicción de anti-leishmaniales y anti-chagásicos. Coeficiente de Spearman igual a 0.1735; **A:** Distribución de frecuencias de probabilidades en el modelo de anti-leishmaniales; **B:** Correlación entre los rangos de las probabilidades de efecto anti-leishmanial en función de los rangos de las probabilidades de efecto anti-*T. cruzi*; **C:** Correlación entre los rangos de las probabilidades de efecto anti-*T. cruzi* en función de los rangos de las probabilidades de efecto anti-leishmanial; **D:** Distribución de frecuencias de probabilidades en el modelo de anti-chagásicos

Discusión

De los compuestos identificados primariamente por su acción anti-leishmanial (**Tabla 29**), según los ensayos *in silico* e *in vitro*, existían antecedentes de su acción contra *T. cruzi* para la **tioridazina** *in vitro* e *in vivo*^[237-241] y para la **toxoflavina** *in vitro*.^[219] Estos compuestos habían sido predichos además como activos por los modelos anti-*T. cruzi* con probabilidades relativamente altas en el rango de [0.82-0.84].

Tabla 29: Actividad cruzada de anti-leishmaniales y anti-chagásicos

Identificación primaria	Compuesto	pMajor	<i>L. amazonensis</i>		pCruzi	<i>T. cruzi</i>	
			CPM (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)		CPM (µg/mL)	Cl ₅₀ (µM)
<i>Leishmania</i>	Tioridazina	0.999	3.7	0.73±0.1	0.840	Ref.1	-
	Toxoflavina	0.967	2.3	3.8±0.5	0.824	-	0.49 ^[219]
	G0	0.964	1.1	4.7±0.4	0.691	10.0	12.6±1.3
	MbA	0.952	2.1	2.1±0.3	0.699	3.3	5.7±1.1
	MbC	0.938	1.8	2.9±0.3	0.632	10.0	16.9±2.2
	Furvina	0.967	1.5	0.80±0.3	0.689	10.0	13.9±2.1
	UC244	0.951	3.5	2.2±0.4	0.600	30.0	31,0±2.8
	UC245	0.966	1.4	0.93±0.2	0.603	5.3	23.0±3.3
<i>T. cruzi</i>	Ciproheptadina	0.999	10-20	5.8±0.2	0.896	PD	PD
	Levomepromazina	0.978	16-32	14.4±1.2	0.850	-	410±10 ^[242]
	Alprazolam	0.953	50-100	-	0.726	-	5.3±1.4

pMajor: probabilidad de pertenecer a la clase de los compuestos activos contra promastigotes de *L. major*; **pCruzi:** probabilidad de pertenecer a la clase de los compuestos activos contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi*; PD: Pendiente de determinar; **Ref.1:** Existen varios estudios de la eficacia *in vivo* de la tioridazina;^[237-241] sin embargo, la actividad *in vitro* ha sido pobremente caracterizada, siendo la CPM vs. epimastigotes <0.5 µM y contra trypomastigotes >0.5 mM.^[241]

Los **derivados 2-nitrovinilfuránicos**, que fueron activos *in vitro* e *in vivo* contra *L. amazonensis*, también fueron predichos como activos por los modelos para *T. cruzi*, aunque con probabilidades relativamente bajas [0.6-0.7]. Estos compuestos mostraron actividad contra los amastigotes intracelulares de *T. cruzi*; no obstante, los valores de

CI_{50} fueron superiores al valor de corte (10 μM) recomendado para declararlos activos;^[14] excepto para el compuesto bromado en el anillo furánico (2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano, **MbA**) que tuvo actividad parasitocida hasta 3.3 $\mu g/mL$ y una CI_{50} próxima a 5 μM .

Al comparar la actividad de estos compuestos frente a ambos parásitos no se observó una relación aparente entre los valores de CI_{50} (**Gráfico 16**). Pudo comprobarse que los derivados bromados en el anillo son los más activos contra los dos parásitos. Sin embargo, se observó que la metilación en la cadena (UC244 vs. G0 y UC245 vs. MbC) favorece la actividad anti-leishmanial, pero tiene el efecto contrario en la actividad frente a *T. cruzi*.

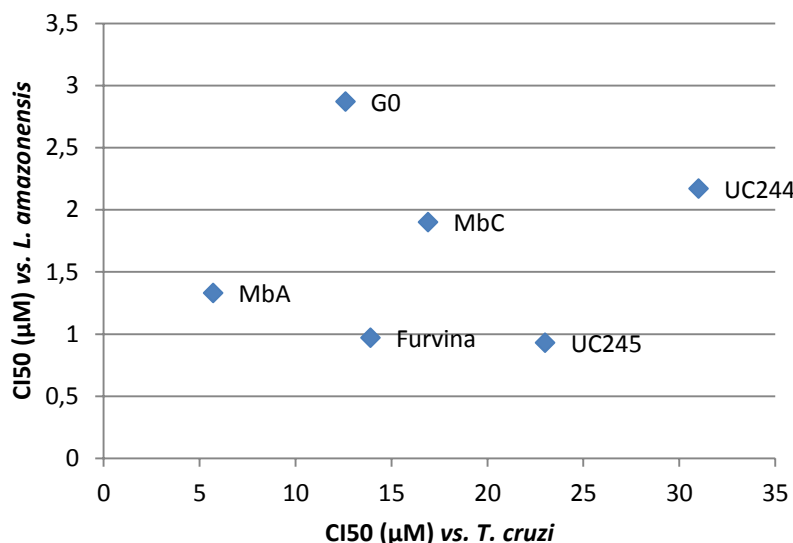


Gráfico 16: Relación entre la actividad de los derivados 2-nitrovinilfuránicos frente a *L. amazonensis* y *T. cruzi*

La **levomepromazina**, es una fenotiazina clasificada como activa por los modelos anti-*T. cruzi* que ha sido previamente evaluada frente a epimastigotes y declarada como activa, aunque su efecto inhibitorio fue solo a altas concentraciones.^[242] Los modelos anti-*L. major* la clasificaron también como activa y experimentalmente su efecto resultó casi 30 veces mayor frente a promastigotes de *L. amazonensis* que contra los epimastigotes de *T. cruzi*.

____ Discusión ____

La **ciproheptadina** fue de los compuestos que clasificó con más alta probabilidad de ser activo contra *T. cruzi*; sin embargo, no pudo ser evaluada frente a *T. cruzi* por razones de disponibilidad del producto. No existen antecedentes de su acción frente a *Leishmania* spp y los modelos anti-*L. major* también la clasificaron con una alta probabilidad de ser activa. Sin embargo, este compuesto no fue priorizado para su evaluación *in vitro* frente a *Leishmania* debido a que se eligieron otros anti-histamínicos (meclozina, difenhidramina) y en particular la loratadina que es estructuralmente similar a ella ($T_c=0.61$, **Figura 19**).

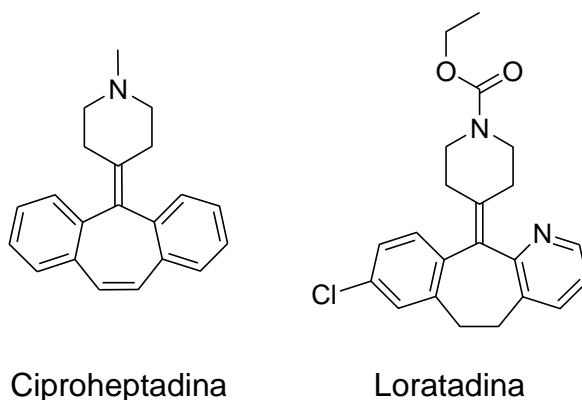


Figura 18: Estructura química de la ciproheptadina y la loratadina

La loratadina fue uno de los compuestos que resultó parasiticida frente a promastigotes de *L. amazonensis* en el rango de 10-50 $\mu\text{g/mL}$ y que, por tanto, no se continuó su estudio *in vitro* a mayor profundidad. Posteriormente, la ciproheptadina mostró actividad parasiticida a concentraciones similares (10-20 $\mu\text{g/mL}$) y una de $\text{CI}_{50}= 5.8\pm0.2 \mu\text{M}$.

El **alprazolam** fue clasificado como activo por los dos sistemas de modelos y fue evaluado primariamente frente a *T. cruzi*, mostrando un adecuado efecto inhibitorio. La evaluación frente a promastigotes de *L. amazonensis*, evidenció también efecto parasiticida e inhibitorio, aunque a concentraciones comparativamente altas.

De modo general pudiera resumirse que mediante el análisis de la actividad cruzada de los compuestos se propició la identificación de la actividad anti *T-cruzi* del MbA y la actividad anti-leishmanial de la ciproheptadina.

DISCUSIÓN

G1. Estudios *in silico*

La calidad y valor predictivo de cualquier modelo, sin importar su naturaleza o uso final, depende de la calidad de los datos empleados en su construcción. Con esta premisa se escogieron las dos bases de datos empleadas en el presente trabajo. En el caso de *Leishmania* se utilizó una base de datos de 196 mil compuestos probados contra promastigotes de *L. major* a 10 μM .^[180, 183] En cambio, para *T. cruzi*, se usó una de más de 303 mil productos probados en un rango de concentraciones que permitieron estimar la CI_{50} frente a amastigotes intracelulares.^[181, 219]

La base de datos de *T. cruzi* es incuestionablemente superior a la de *L. major* por dos importantes razones. La primera y más significativa, es el estadio parasitario frente al que se probaron los compuestos. Para ambas especies es el amastigote la forma en que se presenta el parásito en el humano y, por tanto, la más relevante desde el punto de vista experimental. Adicionalmente, estos parásitos viven dentro de las células del hospedero. Un compuesto informado como activo en la base de datos de *T. cruzi* no solo fue capaz de inhibir la multiplicación del parásito, sino también de atravesar previamente la membrana de la célula hospedera y llegar hasta el parásito. En el caso del sistema empleado para *L. major*, este primer paso es obviado.

El segundo problema radica en el punto final. Es mucho más informativo, exacto y preciso un resultado expresado como la CI_{50} estimada a partir de las inhibiciones del crecimiento a nueve concentraciones diferentes (*T. cruzi*) que la inhibición del crecimiento a una sola concentración (*L. major*).

Además, la concentración de 10 μM es relativamente alta. Si bien esta es la recomendada para cribados primarios,^[14] la potencialidad de los compuestos es mayor si demuestran actividad a concentraciones inferiores, digamos, en el orden de 1 μM . Respecto a ello, los investigadores a cargo de estos estudios insistieron en emplear un sistema poco exigente, en aras de aumentar la probabilidad de encontrar nuevos esqueletos moleculares activos.^[180]

____ Discusión ____

A pesar de estas diferencias, ambas bases de datos gozan de una alta calidad por haber sido desarrolladas cada una en un mismo laboratorio, mediante sistemas robotizados de pipeteo y medición del efecto inhibitorio. Bajo estas condiciones se espera que la variabilidad experimental sea mínima. De este modo, un máximo de la variabilidad observada en la respuesta biológica debe ser explicable por los cambios en la estructura química y consiguientemente, la calidad y el poder predictivo de los modelos son teóricamente óptimos.

En el caso de la base de datos de *L. major*, originalmente, los compuestos fueron clasificados como activos si a la concentración probada inhibían el crecimiento en más del 50% en comparación con los controles negativos. La práctica experimental nos ha demostrado que en una misma placa de cultivos, en una réplica puede inhibirse el crecimiento, digamos a un 55% mientras que otra réplica, a un 45%; solo por mencionar valores probables. Entre ensayos llevados a cabo en momentos distintos las diferencias podrían ser incluso mayores. Es por ello que consideramos que es más prudente, en lugar de escoger un límite de corte puntual, establecer una franja o intervalo de exclusión. Consideramos entonces activos los compuestos que estén por encima del límite superior de este intervalo e inactivos los que tengan una actividad menor que el límite inferior.

Una muestra de 1121 compuestos que resultaron activos en el ensayo primario de *L. major* fue probada posteriormente a 1 μM .^[182] De ellos, 144 fueron activos, o sea mostraron una inhibición del crecimiento superior al 50% a 1 μM . Si se intenta relacionar los resultados de ambos ensayos, se puede ver (**Gráfico 17**) que en la medida en que fue mayor la actividad del compuesto en el ensayo primario, más alta fue su probabilidad de ser activo en el secundario.

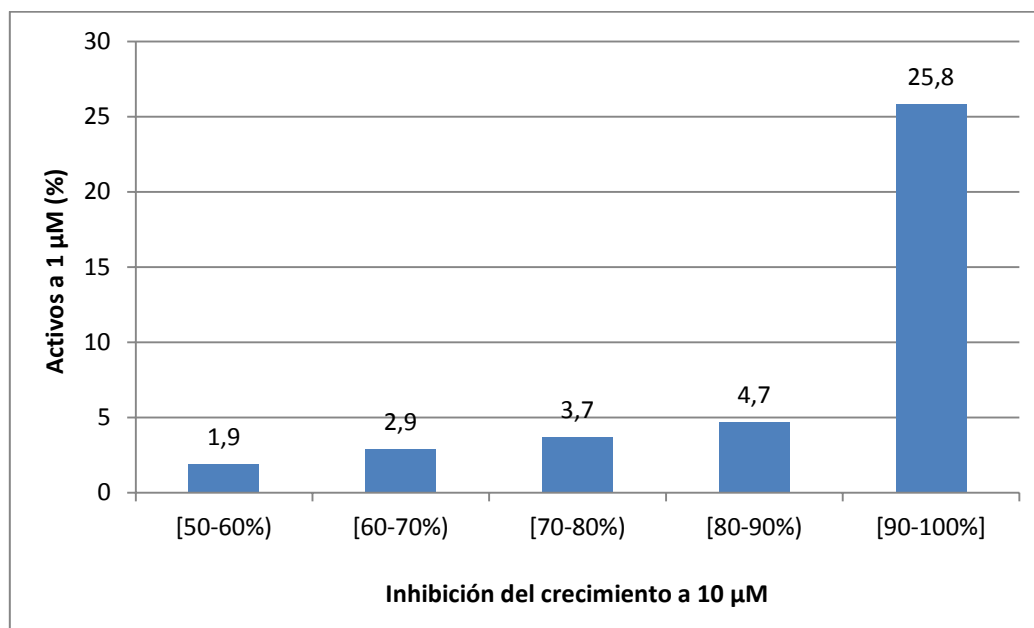


Gráfico 17: Relación entre la actividad de los productos en los ensayos de *L. major* a 10 y 1 µM

Sobre estas bases, y teniendo en cuenta que para el presente trabajo se escogieron como activos solo los compuestos que en el ensayo primario provocaron una inhibición del crecimiento superior al 90%, puede asumirse que los modelos de clasificación desarrollados no solo predicen la actividad frente a *L. major* a 10 µM. De un modo implícito, los compuestos teóricamente clasificados como activos tienen mayor probabilidad de ser también activos a concentraciones inferiores a 1 µM que si se hubieran escogido para el desarrollo de los modelos los compuestos con IC>50%.

De los más de 196 mil compuestos probados por Sharlow et al.,^[180] cerca de 120 mil no mostraron efecto alguno a 10 µM. Estos fueron los que se tomaron como base para seleccionar los compuestos inactivos para la construcción de los modelos. Consideramos que entre tal cantidad de compuestos debe existir suficiente diversidad estructural, además, con un mínimo riesgo de incluir compuestos activos entre ellos.

En el caso de la base de datos de *T. cruzi*, por la abundancia de compuestos activos frente a los amastigotes intracelulares, se escogió como punto de partida para la selección de los compuestos activos aquellos con una CI_{50} inferior a 1 µM. Igual

estrategia fue seguida en un trabajo recientemente publicado usando esta misma base de datos.^[15] Asimismo, se partió de los cerca de 250 mil compuestos con un mínimo de actividad para la selección de los inactivos.

En la conformación de las bases de datos para el desarrollo de los modelos se llevó a cabo una depuración estructural minuciosa que incluyó además una homogeneización de las representaciones, según se recomienda por los expertos en este tema.^[133, 134] Finalmente, se eliminaron los pares de compuestos que constituían precipicios de actividad, o sea, compuestos con marcadas diferencias de actividad y similar estructura química.^[144, 146, 243, 244]

Considerando el modo de selección de los compuestos en el presente trabajo, la diferencia de actividad entre cualquier pareja de compuestos activo e inactivo, debe ser sustancial. Por tanto, se consideraron precipicios de actividad cualquier par de compuestos pertenecientes a clases diferentes con un alto índice de similitud estructural.

La proporción de compuestos formadores de precipicios de actividad puede ser sorprendentemente alta.^[146] En el caso de la base de datos de *L. major* fue del 20.8% y para la de *T. cruzi*, del 22.3%. La frecuencia de precipicios de actividad identificados varía, para una misma base de datos, según la forma de representación química, la metodología para medir las distancias entre compuestos (métrica usada y límite de corte) y la magnitud de la diferencia de actividad considerada como relevante.^[144, 146, 243, 244] En la base de datos de ChEMBL,^[245] por ejemplo, la proporción de compuestos que formaron precipicios de actividad al emplear cuatro métodos distintos fue de 13-41%. Asimismo, en dicho estudio la frecuencia de precipicios de actividad coordinados (entre más de dos compuestos) fue superior a la de precipicios de actividad aislados (entre dos compuestos).^[144] Algo similar ocurrió con las dos bases de datos empleadas en el presente trabajo.

Si bien la exclusión de los CFPA constituye un paso esencial en el curado de las bases de datos para el desarrollo de modelos QSAR,^[133] estos son de gran utilidad en los análisis de las relaciones estructura-actividad y la optimización de compuestos, ya que

de estos se pueden deducir pequeñas modificaciones químicas que producen importantes cambios de actividad.^[144, 243, 244]

Tres parejas de compuestos muy similares y con distinta actividad resaltaron en la base de datos de *L. major* y en la de *T. cruzi*. Sin embargo, tal vez resultan de mayor interés los precipicios de actividad en que participan múltiples compuestos (aunque no sean tan similares), ya que pueden revelar mayor información en un estudio de relación estructura-actividad.

La calidad de los modelos para predecir la actividad de compuestos contra promastigotes de *L. major* fue adecuada y, como era de esperar,^[163, 246, 247] creció en la medida en que se agruparon variables selectas de familias diversas. La fusión de modelos incrementó la sensibilidad, especificidad y precisión; asimismo, aumentó el poder predictivo y la cobertura del dominio de aplicación del sistema de clasificación. Estos son los beneficios esperados al fusionar modelos de naturaleza diversa, ya sea por el tipo de variable o la metodología para la construcción de los mismos.^[164, 165]

Algunos autores prefieren formar multclasificadores que incluyan todos los modelos que se logren con un adecuado nivel de calidad para maximizar tanto el dominio de aplicación como la exactitud en las predicciones.^[133] Nosotros optamos por fusionar el mínimo número de modelos que aportara un cambio sustancial en la calidad de las predicciones.^[164, 248] Entre otras razones, porque con la fusión de solo tres modelos obtuvimos un multclasificador con amplio dominio de aplicación e indicadores de desempeño adecuados. Al mismo tiempo, la adición de otros modelos no tuvo un impacto significativo en la calidad del ensamble.

Si bien la fusión mediante el voto mayoritario es un procedimiento muy empleado en el desarrollo de multclasificadores,^[164-166] nosotros decidimos no utilizarlo ya que el resultado final es dicotómico (Activo/Inactivo), no siendo posible el ordenamiento de los compuestos para priorizar su evaluación. Por demás, se ha demostrado que existe una equivalencia en los resultados de la fusión por el voto mayoritario y por la mediana de las probabilidades siempre que existan dos clases y el número de modelos sea impar.^[164] Tampoco usamos la fusión por el mínimo de las probabilidades debido a que

_____ *Discusión* _____

el resultado es idéntico al obtenido por el máximo cuando solo existen dos clases, independientemente del número de clasificadores incluidos.^[164]

La fusión mediante el producto de las probabilidades consistentemente mostró peor desempeño que los demás métodos, tanto para los multclasificadores de actividad anti-leishmanial como anti-chagásica. Esto probablemente se deba al conocido hecho de que esta regla es muy sensible a las clasificaciones bajas: un valor de probabilidad próximo a cero para una clase por uno de los modelos puede anular la posibilidad de esa clase de ser elegida, independientemente del resultado de los demás clasificadores.^[165]

Los modelos de forma independiente, y también luego de su fusión, mostraron adecuada robustez a juzgar por los resultados de la validación cruzada y de la aleatorización de la variable respuesta. El método de LGO resultó en valores medios de exactitud (e intervalos) próximos a los logrados con las series íntegras, mientras que la aleatorización de la variable respuesta provocó un severo empobrecimiento del desempeño de los modelos. Si el sistema es robusto, la exclusión de un grupo de compuestos en la serie de entrenamiento no debe afectar notablemente su desempeño en la clasificación de la serie de prueba. Por el contrario, se espera un deterioro de la calidad del sistema si, artificialmente, se cambia de forma aleatoria el valor de la variable respuesta en la serie de entrenamiento; conduciendo a tasas de clasificación correcta en la serie de prueba próximas a las de una clasificación al azar, o sea, cerca del 50%.

La exactitud y poder predictivo de los modelos de clasificación de la actividad frente a promastigotes de *L. major* fue sustentada no solo por la exactitud de las clasificaciones en la serie de entrenamiento, la serie de prueba y la serie externa. También fue evidenciado por la clasificación correcta de la anfotericina B, la miltefosina, la paromomicina y la pentamidina, fármacos usados para el tratamiento de la leishmaniosis.

Los derivados de antimonio pentavalente (Estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina) que son los clásicos anti-leishmaniales no pudieron evaluarse por los

modelos, ya que son compuestos organometálicos para los cuales la mayoría de los descriptores son calculados erróneamente por los programas.

Teóricamente el programa DRAGON puede calcular los descriptores de las moléculas que contengan cualquiera de los siguientes 38 átomos: H, B, C, N, O, F, Al, Si, P, S, Cl, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Mo, Ag, Cd, In, Sn, **Sb**, Te, I, Gd, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi.^[134, 140] Sin embargo, este fue incapaz de calcular para los antimoniales pentavalentes el valor de ALOGP (Coeficiente de partición octanol-agua de Ghose-Crippen-Viswanadhan). ALOGP se calcula con una ecuación de regresión a partir de las contribuciones de hidrofobicidad de los distintos átomos que componen la molécula.^[249] Es de notar que ALOGP es calculado por el programa DRAGON solo para moléculas que contengan C, H, O, N, S, Se, P, B, Si y halógenos, lista en la que queda excluido el Sb.^[140]

El programa también calculó un valor igual a cero de AMR (Refractividad molar) para las dos moléculas de antimoniales pentavalentes. Del mismo modo, este descriptor solo es calculado para estructuras que contengan los átomos citados anteriormente.

Como estos dos descriptores están incluidos en el multclasificador, si se hubiera predicho la actividad de los antimoniales pentavalentes, la exactitud de los resultados hubiera sido incierta. De cualquier manera, ambos compuestos hubieran sido excluidos durante el curado de la base de datos por ser mezclas (**Figura 4**) y, muy probablemente, también estarían fuera del dominio de aplicación de los modelos por ser organometálicos.

La clasificación *in silico* como activos, de un grupo de compuestos cuyo efecto anti-leishmanial ya ha sido descrito en la literatura científica, también avala la capacidad predictiva de los modelos.

La modelación de la base de datos de *T. cruzi* requirió mayor esfuerzo. La clasificación mediante análisis discriminante lineal resultó insuficiente, aun cuando se combinaron descriptores de distintas familias. Fue por ello que se recurrió al análisis de k-vecinos más cercanos como método no lineal, sospechando que las relaciones subyacentes

entre los descriptores y la actividad no fueran lineales. Si bien los resultados fueron ligeramente superiores, tampoco resultaron satisfactorios para emplear los modelos como herramientas para la búsqueda de compuestos activos.

La fusión de los modelos obtenidos por ADL y k-NN finalmente mostró mejores indicadores de desempeño, aunque inferiores a los obtenidos para los anti-leishmaniales: la exactitud en la serie externa del multclasificador para anti-chagásicos fue del 85.4% y la precisión del 84.8%, mientras que para los anti-leishmaniales estas fueron del 91.8% y el 90.4%, respectivamente.

Recientemente se ha propuesto el índice de modelabilidad (MODI) para estimar cuán modelable es una base de datos. Valores de MODI superiores a 0.65 se corresponden con bases de datos modelables.^[149] Para las dos bases de datos usadas en el presente trabajo se obtuvieron valores apropiados de MODI. El valor calculado para la base de datos de los anti-chagásicos (MODI=0.75) fue ligeramente inferior a la de los anti-leishmaniales (MODI=0.79); aunque, probablemente, estas diferencias no sean relevantes. Debido a su reciente introducción se requiere del acúmulo de mayor información para una correcta interpretación y aplicación práctica de este índice.

Empleando la misma base de datos de anti-chagásicos y modelos bayesianos de clasificación Ekins y colaboradores^[15] lograron resultados similares a los nuestros, tal vez, ligeramente inferiores. No obstante, la comparación no es del todo procedente, pues ellos usaron distintos criterios de validación: no emplearon una serie de prueba ni externa e informaron como indicadores de desempeño el área bajo la curva ROC, la sensibilidad y la especificidad de la validación cruzada (5X). Las áreas bajo las curvas ROC en su modelo fueron del orden de 0.8, mientras que para los nuestros, en la serie externa, estuvieron por encima de 0.9. Asimismo, ellos describen valores de exactitud, sensibilidad y especificidad de 84, 77 y 89%, respectivamente; siendo en nuestros modelos de 85.4, 86.3 y 84.5%, respectivamente. Insistimos en que la comparación no es totalmente válida al ser los criterios de desempeño y robustez diferentes en ambos casos. Es muy significativo que el valor predictivo del modelo de Ekins y colaboradores

quedó corroborado experimentalmente con la identificación de compuestos activos *in vitro* e *in vivo*.

Bellera y colaboradores^[171] desarrollaron un modelo de clasificación por análisis discriminante lineal empleando ocho descriptores 2D calculados en el programa DRAGON para diferenciar compuestos inhibidores de la cruzipaina. La base de datos era comparativamente pequeña (161 compuestos) y fue fragmentada en una serie de entrenamiento y otra de prueba, sin incluir una serie externa en su diseño. En la serie de prueba obtuvieron 81% de sensibilidad, la especificidad de 90.5% y una exactitud del 88%. La exactitud en la validación cruzada (20X, prediciendo los compuestos excluidos, no la serie de prueba) fue del 79%. Estos adecuados indicadores fueron corroborados con la identificación de un compuesto (levotiroxina) inhibidor de la cruzipaina ($CI_{50} = 38.4 \pm 6.8 \mu M$) y de la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* ($CI_{50} = 121.8 \pm 11.4 \mu M$). No obstante, los valores de CI_{50} en ambos sistemas reflejaron una actividad relativamente baja.

De los estudios *in silico* puede concluirse que:

- 1) Se desarrollaron modelos de clasificación de la actividad *in vitro* de compuestos frente a promastigotes de *L. major* y amastigotes de *T. cruzi*.
- 2) Los modelos tuvieron adecuados indicadores de ajuste y robustez.
- 3) Los fármacos en uso para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas fueron adecuadamente clasificados por los modelos.
- 4) Existe un grupo notable de compuestos cuya actividad contra *Leishmania* o *T. cruzi* ha sido descrita en la literatura que fueron clasificados como activos por los modelos; lo cual avala su poder predictivo.
- 5) Se identificaron compuestos potencialmente activos frente a cada uno de los parásitos en bases de datos de medicamentos en uso con otras indicaciones, y en particular en el Cuadro Básico de Medicamentos de Cuba.

G2. Ensayos biológicos

G2.1. Actividad anti-leishmanial

La cinética de crecimiento de los parásitos se estudió antes de evaluar la actividad *in vitro* de los compuestos de ensayo para determinar la extensión de la fase de crecimiento exponencial y conocer el momento en que se inicia la fase estacionaria. El conocimiento del intervalo de crecimiento exponencial permite establecer la frecuencia de pases para el mantenimiento de los cultivos en el laboratorio y permite garantizar que se lleven a cabo los ensayos de actividad de los compuestos durante el período de multiplicación activa de los parásitos. Asimismo, es crucial conocer el tiempo de inicio de la fase estacionaria para la infección experimental de los ratones debido a que los promastigotes son infectantes cuando alcanzan la fase de crecimiento estacionario.

A diferencia de muchos microorganismos cuya infectividad es máxima durante la fase exponencial, los promastigotes de *Leishmania* son más infectivos luego de la metaciclogénesis, que en condiciones de cultivo *in vitro* ocurre durante la fase estacionaria de crecimiento.^[250, 251]

Las tres cepas estudiadas mostraron similar patrón de crecimiento en las condiciones ensayadas. La duración de las distintas fases del cultivo coincidió con la descrita para los promastigotes de estas y otras especies de *Leishmania* en medios líquidos.^[252-254] Pudo identificarse un período de crecimiento exponencial entre las 24 y 72 h de cultivo que permitió establecer una frecuencia de pases cada 3-4 días para mantener los cultivos en multiplicación activa. Sobre esta misma base se pudo fijar un tiempo de exposición de 72 h de los parásitos a los compuestos antes de realizar la cuantificación del efecto inhibidor del crecimiento.

Aunque el principio de la fase estacionaria fue evidente, su culminación no lo fue ya que no pudo demostrarse la fase de declive. Cuando se usa p-nitro-fenil-fosfato para estimar la densidad celular, todos los parásitos presentes, ya sean vivos o muertos, se cuantifican de manera similar.^[221, 255] Por tal razón, no fue posible visualizar el momento en que la tasa de muertes supera el ritmo de multiplicación, es decir, la fase de declive.

Sin embargo, a los efectos de la infección experimental de los ratones con *L. amazonensis* pudo establecerse una incubación de 4-5 días para obtener promastigotes cuya infectividad fue demostrada en estos y otros varios ensayos que no se describen en el presente documento.

Los ensayos de citotoxicidad frente a la sublínea celular KB derivada de células HeLa permitieron valorar el grado de especificidad de la actividad inhibitoria observada frente a los promastigotes. Esta línea celular crece en suspensión y se multiplica activamente, de modo que el efecto citotóxico observado puede ser reflejo tanto de la inhibición de la multiplicación como de efectos tóxicos letales para la célula. De esta forma, este ensayo puede medir además eventos subletales que no se observan en células diferenciadas sin capacidad de división como los macrófagos peritoneales de ratón.

De los 20 compuestos ensayados que fueron potencialmente activos según los modelos de predicción, siete mostraron actividad parasitocida frente a los promastigotes de *L. amazonensis* a concentraciones inferiores a 10 µg/mL. De estos, seis tuvieron además valores de $CI_{50} < 10$ µM. Esto representa una tasa de éxito del **30%**. Si también consideramos los 18 compuestos predichos como activos, cuya actividad anti-leishmanial ya ha sido descrita anteriormente, se pudiera asumir una tasa de éxito incluso mayor. Comparativamente, de la colección de 196'444 compuestos probada por Sharlow y colaboradores frente a promastigotes de *L. major* 17'620 resultaron activos a 10 µM, o sea, solo el **9%**.^[180]

La tioridazina, la meclozina, la toxoflavina y la furvina fueron los compuestos más activos. Distintos autores recomiendan diferentes valores de corte para los índices de selectividad, oscilando entre 10 y 20.^[14, 256] Sin embargo, estas recomendaciones generalmente se refieren a campañas de cribado masivo de productos en los que se aplican filtros rigurosos en aras de reducir sustancialmente la cantidad de compuestos que pasan a la fase siguiente. Esto guiado por criterios económicos, pues en la medida que progresa el desarrollo del fármaco mucho más costosos se hacen los ensayos.^[9, 10]

En el caso del reposicionamiento de fármacos el escenario es algo distinto. De antemano se conoce el futuro del fármaco en términos de farmacocinética, toxicología,

_____ *Discusión* _____

formulación, etc.; por tanto, se trata de un compuesto cuya razón de fracaso fundamental está asociada a la actividad, no a la toxicidad. No obstante, en el caso de estos parásitos intracelulares que el compuesto debe penetrar la célula causándole el menor daño posible, llegar al parásito y destruirlo, debe existir, necesariamente, un adecuado balance de actividad y citotoxicidad. En resumen, consideramos que en el ambiente del reposicionamiento de fármacos, muy en particular para enfermedades olvidadas, no se deben asumir esquemáticamente recomendaciones que pueden ser muy válidas para el desarrollo de proyectos de la industria farmacéutica basados en el cribado masivo de compuestos. Es por ello que, a pesar de su reducido índice de selectividad, se procedió al estudio de los derivados 2-nitrovinilfuránicos en animales.

El **carvedilol** y el **droperidol** fueron los menos activos, aunque también fueron los menos citotóxicos. En términos de prioridad se decidió no continuar con estos productos por contar con otros más activos. Se consideró además que el efecto farmacológico primario de estos compuestos probablemente sobrepasaría la acción anti-leishmanial a juzgar por la actividad *in vitro* observada.

El **clomifeno** mostró actividad frente a los promastigotes, aunque también fue algo citotóxico para las células KB. Este pertenece a un grupo de compuestos llamados moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (MSRE). Según su estructura, estos compuestos pueden tener acción agonista o antagonista en los distintos tejidos con receptores para los estrógenos, dependiendo su acción además del tipo de tejido y del ambiente hormonal.

El clomifeno causa en la hipófisis la liberación de la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH), favoreciendo la ovulación. En el tejido mamario tiene acción antiestrógenos (de ahí su uso como coadyuvante de la terapia anti-cancerígena), mientras que en el tejido óseo y en el útero tiene función estrogénica, favoreciendo la mineralización.

El clomifeno es un derivado trifeniletileno (**Figura 20**), de los cuales el más conocido en este campo es el tamoxifeno.

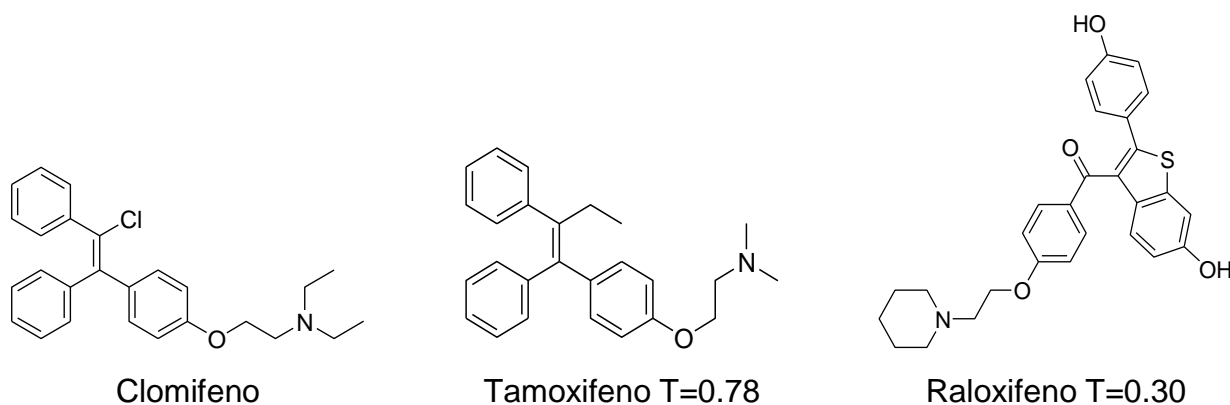


Figura 19: Estructura química del clomifeno y otros moduladores selectivos de los receptores de estrógenos

Es importante notar que la actividad *in vitro* del tamoxifeno frente a varias especies de *Leishmania*^[257] y en modelos animales de leishmaniosis cutánea por *L. major*,^[258] y *L. amazonensis*^[259] así como en modelos de leishmaniosis visceral por *L. braziliensis* y *L. chagasi* ya ha sido documentada.^[260] Se ha descrito que la actividad del tamoxifeno frente a los amastigotes intracelulares es potenciada por la inducción de una rápida y duradera alcalinización de la vacuola parasitofora.^[257] También existen evidencias de que el tamoxifeno es activo contra *T. cruzi in vitro*, aunque resultó ineficaz en un modelo murino de la enfermedad de Chagas aguda.^[261]

A pesar de que no sería novedoso el descubrimiento de la acción anti-leishmanial de un derivado trifeniletileno si se demostraba la actividad del clomifeno, se decidió evaluarlo frente a los promastigotes por si resultaba más activo que el tamoxifeno. Los valores de Cl_{50} descritos para el tamoxifeno son comparables a los obtenidos en el presente trabajo para el clomifeno (2.8 μM) y están en el rango de 1.9-20 μM .^[257, 262]

En los ratones infectados y tratados experimentalmente con tamoxifeno, debido a su acción anti-estrogénica, se ha observado inflamación escrotal y cambios histológicos en el testículo que pudieran comprometer seriamente la fertilidad de los mismos.^[258] Por estos antecedentes de toxicidad del tamoxifeno y considerando los resultados con el clomifeno se decidió no continuar los estudios *in vitro* e *in vivo* con este compuesto. No obstante, teniendo en cuenta la existencia de varios derivados trifeniletilénicos en uso

clínico (**Anexo 6**), así como la actividad mostrada por el tamoxifeno y el clomifeno, pensamos que valdría la pena hacer en el futuro estudios de estructura-actividad con este grupo de compuestos.

Otro modulador selectivo de los receptores de estrógenos, el raloxifeno que es estructuralmente diferente (**Figura 20**) al clomifeno ha mostrado también acción anti-leishmanial *in vitro* e *in vivo*.^[263] Estudios de estructura-actividad mostraron que los benzotiofenos (que incluyen al raloxifeno) más activos contra *Leishmania* carecían del farmacóforo para los receptores de estrógenos, sugiriendo que la actividad anti-leishmanial de estos compuestos es independiente de la interacción con los receptores de estrógenos.^[264] Tales antecedentes confirman el potencial como anti-leishmaniales de los moduladores selectivos de estrógenos.

La **meclozina** (clorhidrato) es un derivado de la piperazina, antagonista de los receptores H1 de la histamina que tiene, además, cierta acción anti-colinérgica. Es usada como anti-histamínico, anti-emético y para el tratamiento del vértigo.^[214] En el ensayo de actividad frente a promastigotes de *L. amazonensis* mostró acción parasitocida e inhibición del crecimiento a bajas concentraciones. Su perfil de selectividad fue adecuado, considerando que la CI_{50} frente a las células KB (citotoxicidad) fue 25 veces mayor que la CI_{50} para los promastigotes. Similares resultados se obtuvieron frente a los amastigotes intracelulares y los macrófagos peritoneales de ratón empleados como células hospedadoras. La susceptibilidad de los amastigotes a la meclozina fue casi dos veces menor que la de los promastigotes, aun así, el índice de selectividad fue adecuado ($IS=17$). La citotoxicidad de la meclozina frente a las células KB y los macrófagos peritoneales de ratón fue similar.

A 100 y 50 mg/kg la meclozina no mostró un efecto significativo ni una relación dosis-efecto aparente sobre el crecimiento de las lesiones ni sobre la carga parasitaria en los tejidos infectados. La meclozina es un medicamento seguro en humanos, lo cual se correspondió con que los ratones toleraron dosis diarias de hasta 200 mg/kg sin manifestar reacciones adversas o pérdida de peso y ninguno de ellos murió durante los 15 días de administración y las otras dos semanas posteriores de seguimiento. No

obstante, se probó como dosis máxima 100 mg/kg teniendo en cuenta que dosis superiores carecerían de relevancia con relación a las dosis habituales usadas como anti-histamínico (50-100 mg/d en adultos).^[214, 265] Según relaciones alométricas entre ratones (20 g) y humanos (60 kg) 100 mg en el hombre se corresponden con 20.6 mg/kg en el ratón,^[266] por lo que consideramos irrelevante evaluar dosis superiores a cinco veces la equivalente a la dosis máxima recomendada en humanos.

La **toxoflavina** es una toxina bacteriana producida por *Pseudomonas cocovenenans* y *Burkholderia glumae*. Juega un papel importante en las intoxicaciones por alimentos (harinas) fermentados y en la pudrición del arroz.^[267] La toxoflavina tiene acción antibacteriana, antifúngica y antitumoral. Sin embargo, su interés médico fundamental ha estado centrado en su uso como antitumoral. Además de su efecto antiproliferativo, induce apoptosis en las células tumorales y reduce su migración.^[268] Para aumentar su especificidad antitumoral se han diseñado profármacos glicosilados a partir de derivados de la toxoflavina para usarlos como terapia de profármaco-enzima dirigida por anticuerpos.^[269]

Este compuesto mostró actividad a bajas concentraciones frente a los promastigotes y un índice de selectividad apropiado (IS=19), a juzgar por la citotoxicidad para las células KB. La citotoxicidad de la toxoflavina frente a los macrófagos peritoneales de ratón fue similar a la observada en las células KB, pero la susceptibilidad de los amastigotes intracelulares fue sustancialmente menor que la de los promastigotes, resultando en un bajo índice de selectividad.

Una búsqueda más profunda sobre la toxoflavina reveló que pertenece a un grupo de compuestos denominados “PAINS”, siglas derivadas de los términos en inglés “*Pan-Assay INterfering Substances*”. Ello hace alusión al hecho de que estos compuestos dan resultados positivos en una gran diversidad de ensayos, actuando de forma inespecífica.^[270-272]

En el caso particular de la toxoflavina existen múltiples referencias de su actividad en varios sistemas de ensayo. Sin embargo, en todos los casos no se debe a una

____ Discusión ____

reactividad directa de la toxoflavina con la célula o enzima diana. Esta también puede interferir con otros componentes del sistema de ensayo dando falsos resultados positivos. La toxicidad de la toxoflavina se ha asociado a su participación como transportador de electrones, la producción de peróxido de hidrógeno y la consiguiente activación/inhibición de diversas proteínas.^[270, 273] También se ha descrito que puede interferir en los métodos basados en fluorescencia.^[274]

Muchos ensayos enzimáticos emplean agentes reductores en el medio, como el ditioneitol, para mantener las enzimas en su estado activo. Se ha comprobado que la toxoflavina reacciona con el ditioneitol liberando peróxido de hidrógeno. Este último oxida la cisteína del sitio activo y causa una aparente inhibición enzimática.^[275]

Varios productos naturales con rasgos estructurales de PAINS se encuentran en uso clínico. Entre ellos se encuentran: menadiona, daunorrubicina, doxorubicina, mitomicina C, apomorfina, droxidopa, rifampicina, penicilina y cefalexina, entre otros. Sin embargo, compuestos de este tipo no se consideran adecuados como punto de partida para optimización molecular a no ser que se demuestre una clara relación estructura-actividad, en una serie de compuestos que, preferiblemente, no posean las características “promiscuas” del compuesto original.^[271, 272] Según estos antecedentes, considerando que la toxoflavina no está licenciada como medicamento y por su bajo índice de selectividad en los amastigotes intracelulares se decidió no avanzar este compuesto hacia estudios *in vivo*.

La **tioridazina** es un anti-psicótico de primera generación y químicamente se incluye en el grupo de las fenotiazinas piperidínicas.^[276, 277] Tiene cierta acción antiemética, posee mayores efectos anti-muscarínicos que la clorpromazina y se le asocia una menor incidencia de síntomas extrapiramidales.^[278] No existen antecedentes de la actividad anti-leishmanial de la tioridazina *in vitro* (promastigotes y amastigotes) ni *in vivo*. Sin embargo, se ha demostrado que algunas fenotiazinas, incluyendo la tioridazina, inhiben uno de los sistemas de eflujo activo a través de la membrana en *L. guyanensis*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*.^[279]

La tioridazina resultó letal para los promastigotes a una baja concentración, siendo su CI_{50} frente a estos más de 30 veces inferior a la CC_{50} para las células KB. Contra los amastigotes intracelulares fue ligeramente menos activa, pero aún la selectividad comparada con el efecto sobre las células hospederas fue adecuada.

En el primer ensayo de actividad frente a la leishmaniosis cutánea experimental empleando altas dosis de tioridazina pudo observarse un marcado efecto terapéutico. Tanto el crecimiento de las lesiones como la carga de parásitos en el sitio de la infección se redujeron drásticamente en comparación a los controles no tratados. El efecto de estas dosis fue además comparable al de la anfotericina B a 1 mg/kg, tendiendo incluso a ser ligeramente superior al de esta. Fueron similarmente activas las dosis de 50 y 25 mg/kg, de ahí que se condujera posteriormente un ensayo a dosis inferiores a 25 mg/kg.

En el segundo ensayo se confirmó nuevamente la actividad de la tioridazina a 25 mg/kg, observándose una relación dosis-efecto evidente. Se demostró un efecto significativo en la supresión del desarrollo de las lesiones en comparación a los controles, el cual fue además similar al de la anfotericina B hasta una dosis de tioridazina de 15 mg/kg. En ambos ensayos se observó el efecto desde la primera semana de tratamiento.

También se ha descrito la actividad de la tioridazina frente a *Mycobacterium tuberculosis in vitro*, en modelos experimentales de tuberculosis y en combinación con otros fármacos en pacientes infectados con cepas multirresistentes.^[280-282] Se ha observado un efecto sinérgico entre la tioridazina y los fármacos anti-tuberculosis, particularmente frente a cepas resistentes a estos fármacos.^[283, 284] Sobre la base de estos resultados se ha considerado recientemente un segundo uso de la tioridazina en el tratamiento de la tuberculosis.

M. tuberculosis reside, al igual que los amastigotes de *Leishmania*, en los macrófagos. Llegar al interior del macrófago pudiera ser un inconveniente para muchos compuestos, pero se ha demostrado que la tioridazina se acumula en los macrófagos, alcanzando concentraciones intramacrofágicas superiores a las plasmáticas.^[282, 284]

____ *Discusión* ____

Las fenotiazinas inhiben dos enzimas claves de *T. cruzi*, la tripanotión reductasa y la dihidrolipoamida deshidrogenasa.^[285, 286] En ratones infectados con *T. cruzi*, la tioridazina mejoró significativamente la función cardíaca y el tiempo de supervivencia tanto en la fase aguda de la enfermedad como en la crónica.^[237-240, 287]

La tioridazina es la fenotiazina que menos efectos extrapiramidales produce.^[288] Sin embargo, dado el surgimiento de los anti-psicóticos de segunda generación con mejor perfil de seguridad/eficacia, el uso de la tioridazina se ha discontinuado en varios países, fundamentalmente desarrollados.^[282] A dosis terapéuticas la tioridazina puede producir trastornos en la repolarización cardíaca, prolongación del intervalo QTc, síndrome de torsade de pointes e incluso, muerte súbita.^[289, 290] No obstante, estos efectos adversos cesan una vez que se suspende la administración del medicamento.

Por mucho, los problemas de seguridad de la tioridazina son menos severos que los de los anti-leishmaniales en uso. Cabe añadir la potencialidad de desarrollar una formulación para administración tópica a partir de la tioridazina, útil para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea. Dado su tamaño molecular relativamente reducido (MW= 370.6 g/mol) y su alta lipofilicidad ($\log K_{o/w}$ = 5.90) es factible obtener una formulación con adecuada penetrabilidad percutánea.

La **furvina** es un derivado 2-nitrovinilfuránico con una actividad antimicrobiana de amplio espectro que incluye hongos, bacterias y protozoos patógenos.^[246, 291] Es el ingrediente farmacéuticamente activo del DERMOFURAL®, ungüento registrado en Cuba para el tratamiento de infecciones fúngicas de la piel desde el año 2007.^[214]

De todos los compuestos ensayados, la furvina fue la que mostró actividad parasitocida e inhibitoria frente a promastigotes a las concentraciones más bajas. El gran problema de la furvina fue su reducida selectividad, sobre todo en el ensayo de amastigotes intracelulares. Se ha descrito que muchos compuestos activos tienen el potencial de actuar frente a múltiples dianas farmacológicas, de modo que lograr un grado de selectividad adecuado a menudo se convierte en un gran problema durante la optimización molecular.^[292]

Si se hubiera tratado de una campaña masiva de búsqueda de nuevos fármacos llevada a cabo por la Industria Farmacéutica, la furvina hubiera sido excluida en fases tempranas por su pobre índice de selectividad. Sin embargo, por tratarse de un fármaco registrado, con acción antimicrobiana, con buenos antecedentes de seguridad tras su uso clínico por vía tópica, con potencialidades para el tratamiento de la forma más prevalente y desatendida de la leishmaniosis y por existir otros cinco compuestos estructuralmente similares se continuó la investigación con este producto.

Los seis compuestos ensayados mostraron actividad inhibitoria y leishmanicida *in vitro* contra los promastigotes, aunque a concentraciones más altas en comparación con la anfotericina B. Este efecto también pudo visualizarse por la pérdida de motilidad del parásito después de 2-3 h de exposición a los compuestos. Los valores de CI_{50} estimados para los 2-nitrovinilfuranos fueron comparables a los de los fármacos anti-leishmaniales en uso clínico, así como de otros compuestos en investigación considerados activos frente a los promastigotes.^[293-295]

La bromación del núcleo nitrovinilfuránico, ya sea en el anillo furánico o en el radical vinilo, aumentó la densidad de electrones en C1 así como la polarización del doble enlace exocíclico, y en consecuencia, incrementó la actividad anti-leishmanial. Similar efecto tuvo la metilación de C2. En concordancia, el compuesto más activo fue el UC245, que mostró la mayor polarización del doble enlace y la más alta densidad electrónica en C1; en cambio, el menos activo fue el G0 que tuvo los valores mínimos de densidad electrónica y de polarización del doble enlace.

El mecanismo de acción antibacteriana descrito para la furvina, que no es necesariamente el mismo frente a los promastigotes de *Leishmania* ni para el resto de los compuestos ensayados, consiste en la inhibición de la síntesis de proteínas por acción sobre la subunidad ribosomal 30S. La furvina se une al sitio P de decodificación (o cerca de él) e inhibe su función, interfiriendo en la unión del fMet-tRNA durante la formación del complejo de iniciación ribosomal 30S, bloqueando con ello la traducción.^[296] La furvina también inhibe varias enzimas claves, incluyendo la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la malato

____ Discusión ____

deshidrogenasa, la glutatión reductasa y la UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil transferasa.^[236, 297]

La reacción química más probable por la que actúan los derivados 2-nitrovinilfuranos es la adición nucleofílica al doble enlace exocíclico.^[236, 297] Estas reacciones se ven favorecidas por los cambios moleculares que resultan en un aumento de la densidad de electrones en C1.^[298] Las cargas de Mulliken calculadas para los átomos de carbono vinílicos en los derivados 2-nitrovinilfuránicos demostraron que el aumento de la densidad de electrones en C1 estuvo asociada a un aumento de la actividad anti-leishmanial. Sin embargo, estudios previos han demostrado que la actividad antimicrobiana de los compuestos nitrovinilfuránicos puede depender no sólo del compuesto original, sino también de los productos de degradación en medio acuoso y de los productos resultantes de la reacción con biomoléculas.^[236] Por lo tanto, la optimización racional de estos compuestos debe tener en cuenta tanto las propiedades estructurales del compuesto como las de los subproductos potenciales.

La sensibilidad de las células KB a la podofilotoxina (control positivo de citotoxicidad), se correspondió con la descrita en estudios previos.^[299, 300] Los compuestos nitrovinilfuránicos fueron considerablemente menos tóxicos que la podofilotoxina, pero su citotoxicidad aun fue alta. La falta de correlación entre la actividad y la citotoxicidad sugiere que, aunque los nitrovinilfuranos pueden inhibir enzimas compartidas por las células microbianas y las de mamíferos, el efecto global podría depender de diferentes dianas biológicas, lo que hace posible la optimización molecular. Esta es teóricamente factible, debido al pequeño tamaño molecular de estos compuestos, y también se ha sugerido anteriormente para su uso como fármacos antibacterianos.^[236]

Dos derivados nitrovinilfuránicos fueron seleccionados para los ensayos *in vivo*: la furvina, del que se dispone de suficiente información químico-farmacéutica, preclínica y clínica que agilizaría la indicación para la leishmaniosis cutánea en caso de que funcionara; y el **UC245** que resultó el menos tóxico y con mayor índice de selectividad según los ensayos *in vitro* y pruebas toxicológicas preliminares.

Los estudios en animales utilizando ratones Balb/c, una línea consanguínea de ratón altamente susceptible a *L. amazonensis*,^[227] demostraron la actividad de los compuestos seleccionados. Se realizaron dos experimentos iniciando el tratamiento inmediatamente después de la aparición de lesiones nodulares: el primero administrando los compuestos cada 24 h; y el segundo, cada 12 h. En ausencia de suficiente información farmacocinética, el segundo experimento se llevó a cabo como un intento de aumentar la exposición *in vivo* de los parásitos a los compuestos; no obstante, la dosis de furvina tuvo que reducirse a la mitad para evitar la toxicidad.

Aunque los resultados de ambos ensayos fueron comparables, se logró una reducción superior del crecimiento de las lesiones cuando se aumentó la frecuencia de administración. A los 28 días de seguimiento, el tamaño medio de la lesión de los ratones tratados con furvina y UC245 fueron 71% y 86% (respectivamente) con respecto al grupo control cuando se administraron cada 24h. Sin embargo, cuando los productos se administraron cada 12h, fueron el 59% y 55% (respectivamente) del tamaño de las de los controles.

Aun cuando la dosis usada de UC245 fue 40 veces superior a la de furvina (gracias a su menor toxicidad) y a pesar de que estos dos compuestos resultaron similarmente activos *in vitro*, no se logró un efecto terapéutico adicional mediante el aumento de la dosis de UC245. Aunque no hay datos farmacocinéticos para apoyar esta afirmación, pensamos que podría ser consecuencia de un rápido metabolismo y/o excreción del UC245 en comparación con la furvina. Coincide con esta suposición el hecho de que la dosis máxima tolerada de UC245 cada 24 h es similar a cuando se administra cada 12 h. En cambio, la dosis máxima tolerada de la furvina cada 24 h es de 5 mg/kg y cada 12 h es 2 mg/kg.

En el tercer estudio en animales, el tratamiento comenzó después de que las lesiones habían evolucionado de manera crónica. En este caso se midieron los diámetros latero-medial y dorso-plantar de las extremidades para hacer una mejor estimación del tamaño de la lesión, ya que la infección provocó además un ensanchamiento de la pata inoculada. Es por ello que se informaron los resultados en milímetros cuadrados en

lugar de milímetros lineales. La dosis de anfotericina B también se aumentó a 5 mg/kg, cada 48 h, tratando de aumentar su eficacia en el modelo animal. Este esquema permitió administrar una dosis total acumulada de anfotericina B 2.5 veces mayor y ha sido empleado en el tratamiento experimental de la leishmaniosis visceral, aunque administrándola solo en tres ocasiones en lugar de siete.^[227] Aun así, la respuesta clínica a la anfotericina B fue moderada: el tamaño de la lesión de los ratones al final del tratamiento fue del 90% en comparación con la de los controles no tratados, mientras que en los tratados con fuvina las lesiones llegaron al 56% del tamaño de las de los controles.

Por la elevada susceptibilidad de los ratones Balb/c a *L. amazonensis*,^[301] este modelo animal se ha utilizado ampliamente para probar la eficacia *in vivo* de compuestos en investigación.^[259, 302-305] Si bien se demostró una respuesta a los compuestos de ensayo y a la anfotericina B, no se logró una cura clínica completa. Se plantea, sin embargo, que aun cuando no se logre curación con el producto ensayado se debe valorar cualquier efecto biológico estadísticamente significativo observado en este modelo debido a su alta sensibilidad y marcada tendencia a la progresión clínica.^[259, 306]

La **anfotericina B**, medicamento usado como control positivo para los ensayos *in vitro* e *in vivo*, resultó activa contra las tres especies de *Leishmania* probadas y su CI_{50} estuvo en el rango descrito anteriormente para este producto.^[293, 307] La eficacia parcial de la anfotericina B ha sido descrita^[308, 309] y se ha asociado a la alta tasa de multiplicación de los parásitos en el sitio de infección.^[310]

Por nuestra insatisfacción con los exiguos resultados experimentales de la anfotericina B en los distintos ensayos (y otros conducidos al margen del presente trabajo), en contradicción con la alta eficacia clínica de este fármaco, incluso frente a cepas resistentes a los antimoniales, decidimos explorar otros esquemas de tratamiento con anfotericina B.

Previo a los estudios descritos en este documento probamos distintos esquemas de infección y tratamiento con anfotericina B a 1 mg/kg (resultados no publicados). Demostramos que mientras mayor es el inóculo (5×10^5 , 10^6 ó 10^7 promastigotes) más

rápido se desarrollan las lesiones, mayor diámetro alcanzan estas y con mayor probabilidad se demuestran las diferencias entre los animales tratados y los controles. Evaluamos también la influencia del tiempo que media entre la infección y el inicio del tratamiento y comprobamos que mientras más temprano se inicia la terapia, mayor actividad muestra la anfotericina B.

Contradictoriamente, esto último no ocurrió cuando se empleó el esquema de 5 mg/kg cada 48h. La actividad de la anfotericina B a esta dosis fue similar, independientemente del tiempo en que se inició el tratamiento (resultados no publicados). Es por ello que surgió la hipótesis de que la actividad parcial de la anfotericina B en este modelo animal se debe a una sub-dosificación. En consecuencia, se realizó el ensayo de dosis-efecto a razón de 5, 7.5, 10 y 12.5 mg/kg. La máxima dosis usada en este contexto ha sido de 12.5 mg/kg durante 10 días consecutivos, lográndose una reducción significativa del 80-85% en el tamaño de las lesiones,^[180] de ahí que se escogiera 12.5 mg/kg como la mayor dosis a probar. Cabe añadirse que, según nuestra experiencia, dosis superiores pueden causar mortalidad por administración a dosis única en dicho biomodelo.

Fue evidente una relación dosis-efecto, siendo estadísticamente demostrable el menor tamaño de las lesiones de los ratones tratados en comparación a los controles, incluso con la dosis de 5 mg/kg. Estos resultados estuvieron en correspondencia con los ensayos anteriores en que se usó esta dosis. Sin embargo, se requirió un mínimo de 7.5 mg/kg para que se produjera una reducción de las lesiones con respecto al momento de inicio del tratamiento. Aparentemente, al cabo de tres semanas después de concluido el tratamiento se producía una curación en estos ratones, llegando las lesiones a desaparecer prácticamente. Sin embargo, hubo un resurgir de las mismas en los ratones tratados con las dosis de 7.5 y 10 mg/kg a partir de la cuarta semana de concluido el tratamiento. Notoriamente, la nueva evolución de las lesiones estuvo inversamente relacionada con la dosis de anfotericina B en el sentido de que las tratadas con la dosis más baja crecieron más rápidamente.

La dosis de 12.5 mg/kg tuvo un efecto “curativo” más prolongado. No obstante, ocho semanas después de retirado el tratamiento las lesiones de estos ratones también se

____ Discusión ____

reactivaron. Solo uno de los diez ratones de este grupo mostró curación clínica aparente durante los cuatro meses de seguimiento una vez concluido el tratamiento.

La mayoría de los autores que usan la anfotericina B como control positivo la administran a 1 mg/kg durante 14-21 días. Esta dosis coincide con la usada en humanos, obviando las relaciones alométricas entre ambas especies. Sin embargo, según las proporciones de masa y superficie corporal la dosis equivalente en humanos sería de 12.3 mg/kg.^[266]

El análisis integral del perfil de eficacia y seguridad de la anfotericina B a diferentes dosis en este modelo animal sugiere que dosis de 7.5-10 mg/kg en días alternos resultan apropiadas para emplearlas como control positivo. Un ensayo llevado a cabo posteriormente (al margen de esta tesis) confirmó la repetibilidad (**Gráfico 18**) del efecto previamente observado sobre la evolución de las lesiones (eficacia) y el peso de los ratones (seguridad).

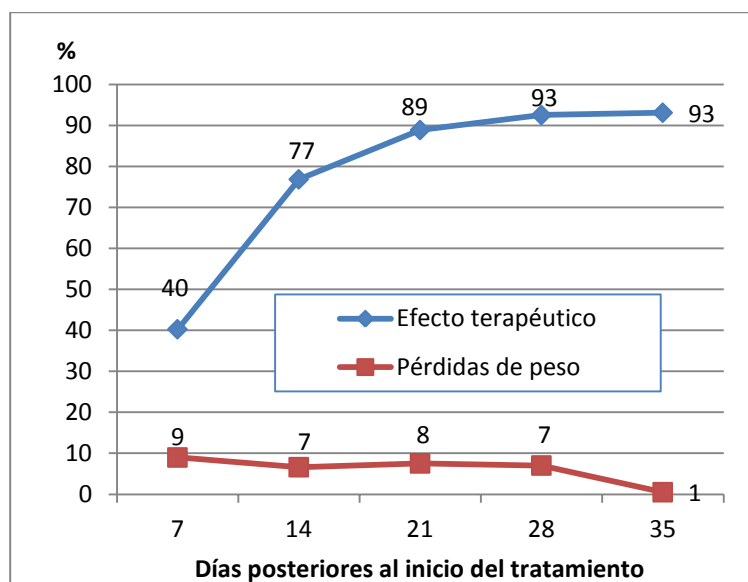


Gráfico 18: Indicadores de seguridad y eficacia de la anfotericina a 10 mg/kg, cada 48, durante 14 días para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea experimental por *L. amazonensis* en ratones Balb/c.

Rara vez se ha descrito la curación clínica definitiva de ratones Balb/c infectados con *L. amazonensis* luego del tratamiento experimental con algún quimioterapéutico en uso clínico o en fase de investigación. Generalmente solo se ha demostrado un retardo del ritmo de crecimiento de las lesiones.^[311-315] Como norma, solo en los casos en que se emplearon moduladores apropiados de la respuesta inmune se logró una reducción del tamaño de las lesiones con respecto al tamaño que tenían antes de iniciada la terapia. Una excepción digna de mencionar es la combinación de amiodarona y miltefosina que produjo curación clínica de los ratones, al menos, durante el año que duró el seguimiento.^[316]

Si bien, la anfotericina B no produce curación parasitológica en pacientes de leishmaniosis la respuesta clínica sí es ostensible. Coherentemente, el mejor escenario esperado en los ratones Balb/c sería el observado con las dosis a partir de 7.5 mg/kg, o sea, una abolición de los síntomas clínicos (tamaño lesional) y la recaída luego de un tiempo de suprimido el tratamiento.

Los ratones Balb/c desarrollan una respuesta inmune preferentemente de tipo Th2 frente a *L. amazonensis* de ahí su elevada susceptibilidad. Consecuentemente, una vez retirada la presión de la quimioterapia, los parásitos remanentes (como en el hombre) se multiplicarían y serían responsables del refloramiento de las lesiones. En oposición, esto no ocurre habitualmente en pacientes, ya que la curación clínica en el hombre va acompañada de una polarización de la respuesta inmune específica a *Leishmania* preferentemente de tipo Th1.^[317, 318]

En teoría, únicamente un compuesto capaz de producir cura estéril o de polarizar adecuadamente la respuesta inmune del ratón Balb/c sería capaz de generar cura definitiva en este modelo animal. No siendo el caso de la anfotericina B, es poco probable obtener mejores resultados a los obtenidos con las dosis superiores a 7.5 mg/kg. Consideramos, sin embargo, que el esquema más frecuentemente empleado, consistente en 14-21 dosis de 1 mg/kg a intervalos de 24 h es insuficiente y que siete dosis de 7.5-12.5 mg/kg, cada 48 h ofrece resultados más coherentes con los observados en la práctica clínica.

____ Discusión ____

Las recomendaciones actuales para ensayos clínicos de fármacos destinados al tratamiento de la leishmaniosis cutánea excluye claramente la total eliminación de los parásitos como criterio de curación.^[319] Esto, basado primordialmente en que ninguno de los fármacos en uso es capaz de producir cura parasitológica, en que no existe correlación entre los resultados parasitológicos y la curación clínica^[320] y en que la persistencia de un reducido número de parásitos se considera beneficiosa en el mantenimiento de la respuesta inmune específica.^[317]

Para la mayoría de las enfermedades infecciosas un fármaco ideal sería capaz de eliminar todos los microbios en el modelo animal. Sin embargo, siendo consecuentes con los resultados clínicos y el conocimiento acumulado sobre la respuesta inmune del ratón Balb/c a *Leishmania*, solo es justo esperar de un buen candidato a fármaco en este modelo animal una reducción del tamaño de las lesiones y de la carga parasitaria, pero no la curación clínica definitiva.

En conclusión, los resultados mostrados sobre la actividad de la tioridazina y la furvina en el modelo de leishmaniosis cutánea experimental utilizado constituyen sólida evidencia del potencial de estos compuestos como anti-leishmaniales.

En el caso de la furvina, la existencia de un formulado de uso tópico (Dermofural®) pudiera representar una alternativa terapéutica para la leishmaniosis cutánea con potencialidad de introducción en la clínica a corto plazo y bajo costo. Su actividad antimicrobiana de amplio espectro^[291] y la alta frecuencia de infecciones bacterianas y fúngicas secundarias que complican la curación de las úlceras en pacientes con leishmaniosis cutánea^[321, 322] añaden valor a esta nueva indicación terapéutica.

Sobre la base de estos resultados, la empresa coordinadora de ensayos clínicos JM Research (www.jmresearch.com) ha presentado el protocolo de ensayo a la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, México) para un estudio clínico fase II aleatorizado, controlado con placebo y a doble ciegos para evaluar la eficacia del Dermofural® en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en México.

G2.2. Actividad frente a *T. cruzi*

De los cinco compuestos probados inicialmente frente a los amastigotes intracelulares uno, el alprazolam, resultó activo con una CI_{50} inferior a 6 μM ($5.3 \pm 1.4 \mu M$), lo cual representa una tasa de éxito del 20%. En comparación con la evaluación robotizada de 303'222 compuestos, de los cuales 4394 resultaron activos, con valores de $CI_{50} < 6 \mu M$ (tasa de éxito 1.45%),^[181] nuestro sistema de selección incrementó la eficiencia en cerca de **14 veces**.

El alprazolam mostró, sin embargo, un estrecho margen de selectividad ($IS < 10$); lo cual, unido a que la dosificación en humanos es muy baja,^[214] limita su posible uso como anti-chagásico.

El diazepam y el midazolam son compuestos estructural y farmacológicamente relacionados con el alprazolam; sin embargo, a diferencia de este último, los modelos anti-*T. cruzi*, los ubican con mayor probabilidad entre los compuestos inactivos. Coincidieron las predicciones con los ensayos *in vitro*, resultando ambos inactivos frente a los amastigotes intracelulares. Estas diferencias de actividad entre compuestos estructuralmente relacionados apoya la perspectiva de llevar a cabo estudios con otros compuestos de este tipo. Entre los medicamentos en uso estructuralmente relacionados con el alprazolam y que fueron predichos con los más altos valores de probabilidad se encuentran: loprazolam ($p=0.96$), nitrazepam ($p=0.921$), clonazepam ($p=0.917$), adinazolam ($p=0.913$) y trepipam ($p=0.905$).

G2.3. Actividad cruzada de compuestos con acción anti-leishmanial y anti- *T. cruzi*

Taxonómicamente *Leishmania* spp y *T. cruzi* tienen igual ubicación hasta el nivel de familia (*Trypanosomatidae*). Por el estrecho nivel de parentesco que poseen, estos organismos muestran alto grado de homología estructural y metabólica. Sobre esta base, la probabilidad de que los compuestos activos frente a *Leishmania* también lo sean contra *T. cruzi*, y viceversa, no debe ser despreciable. Es por ello que se exploró

la actividad cruzada de los compuestos activos frente a uno y otro parásito como estrategia para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas.

Los modelos desarrollados son de naturaleza global, o sea, no están restringidos a un mecanismo de acción específico o a un determinado patrón estructural. Predicen la actividad *in vitro* contra uno y otro parásito. Por tanto, bajo el supuesto de que existe asociación desde el punto de vista biológico entre los dos parásitos, de que hay coincidencia en rutas metabólicas, dianas enzimáticas, etc., cabe esperar que un compuesto que no haya sido reconocido como un candidato potencial por un modelo, o que el modelo no lo haya ubicado entre los de mayor potencialidad, sea indirectamente reconocido por el otro.

Pueden existir compuestos con valores de probabilidad muy altos para uno de los parásitos (lo cual los hace atractivos para los estudios *in vitro*) e intermedios o bajos para el otro. De hecho, este fue el caso para la atropina, el cloranfenicol y la ranitidina; los cuales fueron teóricamente clasificados como activos frente a *T. cruzi* y como inactivos frente a *L. major*. Si bien estos son casos extremos, estas clasificaciones un tanto discordantes, son las que añaden valor a la exploración de la actividad cruzada, pues serían compuestos que, de otro modo, hubieran sido ignorados en la evaluación de la actividad biológica frente a uno de los parásitos.

En esencia, consideramos en este trabajo como una “alerta de probable actividad” si un compuesto resulta biológicamente activo frente al otro parásito, independientemente de su clasificación por los modelos. Con ello no se subvalora el rol de los estudios *in silico*, pues son esenciales en la identificación primaria de los compuestos frente a alguno de los parásitos.

Existe una reconocida tasa de desacuerdo (falsos positivos y falsos negativos) entre los estudios *in silico* y los ensayos biológicos. Esta se incrementa aun más cuando intentamos extrapolar los resultados de un parásito al otro; yendo, en ocasiones, en contra de las predicciones de los modelos para dicho parásito. Sin embargo, se siguió esta estrategia como un intento para maximizar las probabilidades de encontrar

compuestos biológicamente activos, teniendo en cuenta el parentesco genético entre ambos parásitos.

El haber encontrado antecedentes de la actividad anti-*T. cruzi* de la **tioridazina** y la **toxoflavina**, luego de identificar su actividad por los modelos anti-*L. major* y los estudios *in vitro*, si bien resta novedad al trabajo, constituye un sustento de la validez del enfoque de explorar la actividad cruzada de los compuestos.

El **clomifeno** y la **meclozina** fueron los compuestos que con mayor probabilidad clasificaron según los modelos anti-*T. cruzi*, coincidiendo en este caso con las predicciones de los modelos anti-*L. major* y con nuestros resultados de los estudios *in vitro* frente a *L. amazonensis*. Sin embargo, en el momento de las evaluaciones frente a *T. cruzi* no existió disponibilidad de estos compuestos y no pudieron ser evaluados.

El **alprazolam** fue clasificado como activo por ambos sistemas de modelos; por lo que, considerando además el efecto *in vitro* observado frente a *T. cruzi*, se evaluó frente a promastigotes de *L. amazonensis*. Si bien los resultados no son sobresalientes y la dosis diaria máxima recomendada de este producto es baja,^[214] lo cual limita su uso como anti-chagásico y/o anti-leishmanial, alerta sobre la potencial actividad de otros compuestos estructuralmente relacionados y para los cuales existen predicciones favorables de los modelos.

Por esta vía se identificó la acción anti-*T. cruzi* del derivado 2-nitronilfuránico bromado en el anillo (**MbA**), que no fue de los más activos para *Leishmania* spp, y sin embargo, resultó activo a concentraciones próximas a 5 μ M frente a amastigotes intracelulares de *T. cruzi*. Estos productos no hubieran sido probados contra este parásito, pues las probabilidades de actividad calculadas por los modelos fueron inferiores al nivel de corte ($p > 0.7$) fijado para la selección de compuestos.

El **MbA** actualmente no es ingrediente farmacéuticamente activo de ningún medicamento licenciado, por lo que no se avizora su rápida introducción con esta indicación. No obstante, estos resultados amplían las potencialidades de aplicación de los **derivados 2-nitrovinilfuránicos** y sustentan la profundización de las relaciones-

____ Discusión ____

estructura actividad en busca de compuestos con mejor perfil de citotoxicidad-eficacia, según se ha sugerido anteriormente para la identificación de nuevos antibacterianos a partir de estos derivados.^[236]

También mediante el análisis de actividad cruzada fue considerada la evaluación del efecto anti-leishmanial de la **levomepromazina**. Esta resultó casi 30 veces más activa frente a promastigotes de *L. amazonensis* que contra epimastigotes de *T. cruzi*.^[242] No existen antecedentes de su acción anti-leishmanial. Sin embargo, la levomepromazina es una fenotiazina estructuralmente bastante similar a la clorpromazina ($T_c=0.7764$), de la cual existen referencias de actividad anti-leishmanial,^[323, 324] así como de la tioridazina ($T_c= 0.7979$), cuyo efecto ha sido probado en el presente trabajo.

Entre las fenotiazinas en uso clínico y otros nuevos derivados fenotiazínicos se han identificado compuestos activos frente a *Leishmania* spp, *T. cruzi*, *T. brucei*, y *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros. Se ha propuesto que su mecanismo de acción como antimicrobianos pudiera estar relacionado con la formación de radicales catiónicos por oxidación enzimática, los cuales pueden actuar como inhibidores enzimáticos, generadores de radicales libres secundarios o agotadores de metabolitos.^[285, 286, 325] Si bien las potencialidades como antimicrobianos de este grupo de compuestos han sido bastante estudiadas existe una amplia diversidad estructural que a nuestro juicio no ha sido plenamente explorada en la búsqueda de anti-tripanosomatídeos.

La **ciproheptadina**, aun cuando no mostró actividad inhibitoria frente a *L. amazonensis* a concentraciones inferiores a 1 μM como la tioridazina, la furvina y el UC245, su $\text{Cl}_{50}=5.8\pm0.2$ μM llama la atención. Se añade que la loratadina, anti-histamínico estructuralmente similar, también mostró actividad parasitocida a concentraciones de 10-50 $\mu\text{g/mL}$. Debido a su indicación, los antihistamínicos en general se caracterizan por una alta seguridad en administración prolongada.

Desde mediados de los años ochenta del pasado siglo se conoce la actividad *in vitro* frente a promastigotes y amastigotes de *L. donovani* y *L. major* de la clomipramina y la nitroimipramina, compuestos que guardan similitud estructural con la ciproheptadina

($T_c=0.77$ y 0.63 , respectivamente).^[326] También se ha demostrado que la clomipramina ($IC_{50}=12.5-35 \mu g/mL$) tiene un efecto superior a la imipramina ($T_c=0.74$), la desipramina ($T_c=0.67$) y la clorpromazina ($T_c=0.57$) frente a *L. amazonensis*, *T. cruzi*, *Crithidia luciliae* y *Trichomonas vaginalis*.^[327] Más recientemente se ha comprobado que la imipramina revierte la resistencia de *L. donovani* a los derivados de antimonio pentavalente *in vitro*; favorece la proporción de citoquinas IL_{12}/IL_{10} ; e induce curación clínica y reducción de la carga de parásitos en los órganos de los ratones infectados con *L. donovani* resistente a Sb^V y tratados simultáneamente con imipramina y Pentostam.^[328]

Existe en un uso clínico como antihistamínicos, antidepresivos y con otras indicaciones un amplio grupo de compuestos estructuralmente relacionados con la ciproheptadina, de los cuales se anexa a este documento una selección (**Anexo 7**). Considerando los resultados de la ciproheptadina, los antecedentes de actividad de compuestos relacionados y la existencia de una diversidad de compuestos similares en uso clínico pensamos que es recomendable profundizar en la acción anti-leishmanial de los antihistamínicos y antidepresivos tricíclicos similares a la ciproheptadina. También es muy recomendable evaluar la actividad anti-*T. cruzi* tan pronto se disponga del producto para su ensayo.

En resumen, la estrategia de evaluar la actividad cruzada de los compuestos que resultaron activos frente a alguno de los parásitos permitió identificar la potencialidad del **MbA** contra *T. cruzi*. Asimismo, por la relativamente alta probabilidad con que clasificó como activa en el modelo anti-*T. cruzi* se propició el descubrimiento del efecto parasitocida e inhibitorio de la **ciproheptadina** frente a *L. amazonensis*, aun cuando no había sido seleccionada inicialmente para los estudios de actividad anti-leishmanial.

De los estudios *in vitro* e *in vivo* puede concluirse que:

- 1) No mostró actividad ninguno de los compuestos predichos como inactivos que fueron probados *in vitro*, ni frente a *L. amazonensis* ni contra *T. cruzi*; lo cual corrobora la especificidad de los modelos.

____ Discusión ____

- 2) De los compuestos teóricamente selectos para estudios anti-leishmaniales debido a su potencial actividad, el **30%** (6/20) resultó activo frente a promastigotes ($CI_{50} < 10 \mu M$) y el **10%** (2/20) contra amastigotes intracelulares ($CI_{50} < 10 \mu M$, $IS > 10$). Las tasas de éxito correspondientes a estas fases cuando se prueban masivamente grandes colecciones de compuestos son de 8.97%^[180] y 0.06%,^[14] respectivamente; lo cual representa un incremento en la eficiencia de **4 y 167 veces**, respectivamente.
- 3) Los seis compuestos activos ($CI_{50} < 10 \mu M$) frente a promastigotes de *L. amazonensis* fueron: clomifeno, meclozina, tioridazina, droperidol, furvina y toxoflavina.
- 4) La meclozina y la tioridazina resultaron activos ($CI_{50} < 10 \mu M$) frente a los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y tuvieron un índice de selectividad superior a 15.
- 5) Se demostró la actividad anti-leishmanial *in vivo* de la tioridazina, la furvina y el UC245.
- 6) Se demostró que la dosis de anfotericina B normalmente usada como control positivo en biomodelos de leishmaniosis experimental (1 mg/kg, cada 24 h, durante 14-21 días) es baja, recomendándose dosis de 7.5-10 mg/kg y a intervalos de 48 h durante 14 días.
- 7) Se demostró la actividad anti-leishmanial y anti-*T. cruzi* de los derivados 2-nitrovinilfuránicos, siendo más activos los compuestos bromados en la posición 5 del anillo furánico.
- 8) No existió correlación entre la actividad anti-leishmanial de los derivados 2-nitrovinilfuránicos y su citotoxicidad, lo cual sugiere que es posible la optimización molecular de estos compuestos.
- 9) De los cinco compuestos selectos inicialmente para evaluarlos frente a los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* resultó activo el alprazolam, aunque su índice de selectividad fue reducido.
- 10) Mediante estudios de actividad cruzada se identificó un nuevo compuesto activo frente a *Leishmania* (ciproheptadina) y otro frente a *T. cruzi* (MbA).

- 11)** Los derivados trifeniletilénicos (similares al clomifeno), los antihistamínicos y antidepresivos tricíclicos (similares a la ciproheptadina y la tioridazina), y los derivados 2-nitrovinilfuránicos son familias de compuestos que ameritan estudios específicos de estructura-actividad frente a estos dos parásitos.

G. CONCLUSIONES

- ✓ Se desarrollaron modelos de predicción de la actividad contra *L. major* y *T. cruzi* basados en relaciones de estructura química - actividad antiparasitaria con adecuados indicadores de ajuste, robustez y poder predictivo; los cuales fueron empleados satisfactoriamente en la predicción de la actividad de ingredientes farmacéuticos activos de medicamentos con otras indicaciones.
- ✓ Se demostró la actividad de productos selectos por métodos *in silico* en modelos para pruebas de eficacia contra *Leishmania* spp y *T. cruzi*., alcanzándose tasas de éxito superiores a las descritas durante la evaluación masiva de grandes colecciones de compuestos.
- ✓ La evaluación de la actividad cruzada de los productos con efecto inhibitorio y parasiticida frente a *T. cruzi* y *Leishmania* spp permitió incrementar el número de compuestos identificados con potencial para el tratamiento de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas.
- ✓ Se descubrió la actividad de varios compuestos frente a los agentes causales de la leishmaniosis y la enfermedad de Chagas, destacándose la furvina y la tioridazina por su acción contra *Leishmania* spp y el 2-bromo-5-(2-nitrovinil)-furano (MbA) frente a *T. cruzi*.

I. RECOMENDACIONES

- ✓ Desarrollar modelos de predicción que relacionen la estructura química tanto con la actividad como con la citotoxicidad de los compuestos frente a células de mamíferos.
- ✓ Realizar estudios específicos de estructura-actividad frente a estos dos parásitos con derivados trifeniletilénicos (similares al clomifeno), anti-histamínicos y anti-depresivos tricíclicos (similares a la ciproheptadina y la tioridazina) y derivados 2-nitrovinilfuránicos con vistas a una posible optimización molecular y/o a la identificación de compuestos en uso clínico con adecuado perfil de toxicidad-eficacia y características farmacológicas.
- ✓ Continuar los estudios *in vitro* frente a *T. cruzi* y *Leishmania* spp con el resto de los compuestos identificados como potencialmente activos por los modelos computacionales.
- ✓ Emplear la anfotericina B en dosis de 7.5-10 mg/kg y a intervalos de 48 h durante 14 días como control positivo en biomodelos de leishmaniosis cutánea experimental, en lugar del esquema tradicionalmente utilizado (1 mg/kg, cada 24 h, durante 14-21 días).
- ✓ Evaluar la actividad de la furvina, la meclozina y la tioridazina en un biomodelo de leishmaniosis visceral.
- ✓ Evaluar la actividad del Dermofural®, formulado de uso tópico con furvina como ingrediente farmacéuticamente activo, en un biomodelo de leishmaniosis cutánea ulcerativa (ratón Balb/c infectado con *L. major*).

K. REFERENCIAS

1. Alvar, J., et al., *Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35671 %M 22693548 %2 PMC3365071.
2. WHO. *WHO global burden of disease estimates for 2000–2012 [web page]*. 2015 [cited 2015 12 November].
3. Uribarren Berrueta, T. *ENFERMEDAD DE CHAGAS - Recursos en Parasitología - UNAM*. 2015 28/4/2015 [cited 2015 30/6/2015]; Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypa>.
4. Silva-Jardim, I., O.H. Thiemann, and F.F. Anibal, *Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: A critical review*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2014. **25**(10): p. 1810-1823.
5. Maya, J.D., et al., *Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy*. Biol Res, 2010. **43**: p. 323-331.
6. Townson, H., et al., *Exploiting the potential of vector control for disease prevention*. Bull World Health Organ, 2005. **83**(12): p. 942-7.
7. Neves, L.O., et al., *A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by Leishmania guyanensis*. An Bras Dermatol, 2011. **86**(6): p. 1092-101.
8. Sundar, S. and J. Chakravarty, *Investigational drugs for visceral leishmaniasis*. Expert Opin Investig Drugs, 2015. **24**(1): p. 43-59 %M 25409760 %2 PMC4262729.
9. DiMasi, J.A., R.W. Hansen, and H.G. Grabowski, *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. Journal of Health Economics, 2003. **22**: p. 151-185.
10. Adams, C.P. and V.V. Brantner, *Estimating The Cost Of New Drug Development: Is It Really \$802 Million?* Health Affairs, 2006. **25**(2): p. 420-428.
11. Andrews, K.T., G. Fisher, and T.S. Skinner-Adams, *Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases*. Int J Parasitol Drugs Drug Resist, 2014. **4**(2): p. 95-111.
12. Kim, T.-W., *Drug repositioning approaches for the discovery of new therapeutics for Alzheimer's disease*. Neurotherapeutics, 2015. **12**(1): p. 132-42.
13. Sateriale, A., et al., *Drug repurposing: mining protozoan proteomes for targets of known bioactive compounds*. J Am Med Inform Assoc, 2014. **21**(2): p. 238-44.
14. Don, R. and J.-R. Ioset, *Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections*. Parasitology, 2014. **141**(01): p. 140-146.
15. Ekins, S., et al., *Machine Learning Models and Pathway Genome Data Base for Trypanosoma cruzi Drug Discovery*. PLOS Negl Trop Dis, 2015. **9**(6): p. e0003878.
16. Georgiadou, S.P., K.P. Makaritsis, and G.N. Dalekos, *Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment*. Journal of Translational Internal Medicine, 2015. **3**(2): p. 43-50.
17. Lainson, R., et al., *Evolution, classification and geographical distribution*. 1987: Academic Press.
18. Dantas-Torres, F., *Final comments on an interesting taxonomic dilemma: Leishmania infantum versus Leishmania infantum chagasi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2006. **101**(8): p. 929-930.
19. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. Leishmaniasis - Lyfe Cycle*. 2015

- 29/11/2013 [cited 2015 12/9/2015]; Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
20. Reyes, A. and J. Arrivillaga, *Fauna Mammalia asociada a los focos de leishmaniasis neotropical. Situación en Venezuela*. Bol. Mal. Salud Amb, 2009. **49**(1): p. 35-52.
21. Ready, P.D., *Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents*. Annual Review of Entomology, 2013. **58**: p. 227-250.
22. Jacobson, R.L., *Leishmaniasis in an era of conflict in the Middle East*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2011. **11**(3): p. 247-58 %M 20846030 %2.
23. WHO. *Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases: Investing to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases*. in *WHO Informal Meeting on Investment for Impact in the Control of Neglected Tropical Diseases*. 2015. Geneva, Switzerland, 16–17 December 2013: WHO Press.
24. Lukes, J., et al., *Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(22): p. 9375-80.
25. Abubakar, A., et al., *Visceral leishmaniasis outbreak in South Sudan 2009-2012: epidemiological assessment and impact of a multisectoral response*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(3): p. e2720 %M 24675573 %2 PMC3967947.
26. Barnett, P.G., et al., *Virgin soil: the spread of visceral leishmaniasis into Uttar Pradesh, India*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(4): p. 720-5 %M 16222016 %2 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16222016> %@ 0002-9637.
27. Kumar, R., et al., *Kala-azar epidemic in Varanasi district, India*. Bull World Health Organ, 1999. **77**(5): p. 371-4 %M 10361752 %2 PMC2557674 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361752> %@ 0042-9686.
28. Ahluwalia, I.B., et al., *Visceral leishmaniasis: consequences of a neglected disease in a Bangladeshi community*. Am J Trop Med Hyg, 2003. **69**(6): p. 624-8 %M 14740879 %2 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14740879> %@ 0002-9637.
29. Aagaard-Hansen, J., N. Nombela, and J. Alvar, *Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases*. Trop Med Int Health, 2010. **15**(11): p. 1281-8 %M 20976871 %2 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20976871> %@ 1365-3156.
30. Argaw, D., et al., *Risk factors for visceral Leishmaniasis among residents and migrants in Kafta-Humera, Ethiopia*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(11): p. e2543 %M 24244778 %2 PMC3820755.
31. Croft, S.L. and V. Yardley, *Chemotherapy of leishmaniasis*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(4): p. 319-42.
32. WHO, *Control of the leishmaniases (Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010)*, in *World Health Organization Technical Report Series*. 2010, World Health Organization: Geneva. p. 186.
33. Ready, P.D., *Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents*. Annu Rev Entomol, 2013. **58**: p. 227-50.
34. Shao, Q., *Surveillance of kala-azar following preliminary eradication*. Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi, 1982. **3**(1): p. 35.
35. Palatnik-de-Sousa, C.B., et al., *Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2001. **65**(5): p. 510-517.

Referencias

36. Ashford, D.A., et al., *Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 1998. **59**(1): p. 53-57.
37. Moreno, J. and J. Alvar, *Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model*. Trends in parasitology, 2002. **18**(9): p. 399-405.
38. Maroli, M., et al., *Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy*. Medical and veterinary entomology, 2001. **15**(4): p. 358-363.
39. De Luca, P.M. and A.B.B. Macedo, *Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality*. Frontiers in Immunology, 2016. **7**: p. 151.
40. Nadim, A., et al., *Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis*. Bull Soc Pathol Exot Filiales, 1983. **76**(4): p. 377-83.
41. Noazin, S., et al., *First generation leishmaniasis vaccines: A review of field efficacy trials*. 2008.
42. Mayrink, W., et al., *An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil*. Annals of tropical medicine and parasitology, 1985. **79**(3): p. 259.
43. Nagill, R. and S. Kaur, *Vaccine candidates for leishmaniasis: a review*. International immunopharmacology, 2011. **11**(10): p. 1464-1488.
44. Sakkas, H., C. Gartzonika, and S. Levidiotou, *Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis*. Journal of Vector Borne Diseases, 2016. **53**(1): p. 8.
45. Sundar, S., et al., *Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India*. Am J Trop Med Hyg, 2001. **65**(3): p. 193-6.
46. Croft, S.L., S. Sundar, and A.H. Fairlamb, *Drug resistance in leishmaniasis*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(1): p. 111-26.
47. Soto, J., et al., *Intralesional antimony for single lesions of bolivian cutaneous leishmaniasis*. Clin Infect Dis, 2013. **56**(9): p. 1255-60.
48. Bumb, R.A., et al., *Efficacy of short-duration (twice weekly) intralesional sodium stibogluconate in treatment of cutaneous Leishmaniasis in India*. Br J Dermatol, 2010. **163**(4): p. 854-8.
49. Bray, P.G., et al., *Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future*. Trends in parasitology, 2003. **19**(5): p. 232-239.
50. Ellis, D., *Amphotericin B: spectrum and resistance*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2002. **49**(suppl 1): p. 7-10.
51. Croft, S.L. and P. Olliaro, *Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(10): p. 1478-83.
52. Mbongo, N., et al., *Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(2): p. 352-7.
53. Croft, S., et al., *The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani*. Biochemical pharmacology, 1987. **36**(16): p. 2633-2636.
54. Croft, S.L., D. Snowdon, and V. Yardley, *The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1996. **38**(6): p. 1041-1047.
55. Sundar, S., et al., *Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(22): p. 1739-1746.

56. Sundar, S., et al., *Efficacy and safety of miltefosine in treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis*. The Scientific World Journal, 2015. **2015**.
57. Ramesh, V., et al., *Decline in Clinical Efficacy of Oral Miltefosine in Treatment of Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) in India*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(10): p. e0004093.
58. Monge-Maillo, B. and R. López-Vélez, *Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations*. Clinical Infectious Diseases, 2015. **60**(9): p. 1398-1404.
59. López-Carvajal, P.-B. and J. Cardona-Arias, *Eficacia de Los Azoles en el Tratamiento de la Leishmaniasis Cutanea*. Archivos de Medicina, 2016.
60. Ben Salah, A., et al., *Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis*. N Engl J Med, 2013. **368**(6): p. 524-32.
61. Sosa, N., et al., *Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (paromomycin and gentamicin) for cutaneous leishmaniasis in Panama*. The American journal of tropical medicine and hygiene, 2013. **89**(3): p. 557-563.
62. Blum, J., et al., *LeishMan recommendations for treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis in travelers, 2014*. J Travel Med, 2014. **21**(2): p. 116-29 %M 24745041 %2 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24745041> % @ 1708-8305.
63. Salmanpour, R., M.R. Razmavar, and N. Abtahi, *Comparison of intralesional meglumine antimoniate, cryotherapy and their combination in the treatment of cutaneous leishmaniasis*. Int J Dermatol, 2006. **45**(9): p. 1115-6.
64. Asilian, A., et al., *Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis*. Int J Dermatol, 2004. **43**(4): p. 281-3.
65. WHO. *Media centre: Chagas disease (American trypanosomiasis), Fact sheet*. 2016 March 2016 [cited 2016 08/06/2016]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
66. CRAM. *Protozoology Lab exam final Flashcards - Cram.com*. 2016 [cited 2016 24/08/16]; Available from: www.cram.com/flashcards/protozoology-lab-exam-final-2012238.
67. WHO, *Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee*, in *World Health Organization Technical Report Series*. 2002, World Health Organization: Geneva.
68. CDC. *Centers for Disease Control and Prevention. DPDx - Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. American Trypanosomiasis - Lyfe Cycle*. 2015 29/11/2013 [cited 2015 12/9/2015]; Available from: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>.
69. Carcavallo, R., *Geographical distribution and alti-latitudinal dispersion.*, in *Atlas of Chagas' disease vectors in the Americas.*, C. RU, Editor. 1999, FIOCRUZ: Rio de Janeiro. p. 747-792.
70. Jiménez Coello, M., et al., *American trypanosomiasis infection in fattening pigs from the south-east of Mexico*. Zoonoses Public Health, 2012. **59**(Suppl 2): p. 166-9.
71. Jiménez Coello, M., et al., *Epidemiological Survey of Trypanosoma cruzi Infection in Domestic Owned Cats from the Tropical Southeast of Mexico*. Zoonoses and Public Health, 2012. **59**: p. 102-109.

Referencias

72. Uribarren-Berrueta, T. *ENFERMEDAD DE CHAGAS*. Recursos en Parasitología - UNAM 2016 13/6/2016 [cited 2016 23/08/16]; Available from: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>.
73. Bern, C., *Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(26): p. 2527-2534.
74. Chagas, C., *Processos patogenicos da tripanosomiase americana*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1916. **8**(2): p. 5-36.
75. Marín-Neto, J.A., et al., *Pathogenesis of chronic Chagas heart disease*. Circulation, 2007: p. 1109-23.
76. Morillo, C., *Infection with Trypanosoma cruzi and progression to cardiomyopathy: what is the evidence and is the tide finally turning?* Circulation, 2013. **127**: p. 1095-7.
77. Nouvellet, P., Z.M. Cucunub, and S. Gourbiere, *Ecology, Evolution and Control of Chagas Disease: A Century of Neglected Modelling and a Promising Future*. Advances in Parasitology, 2015. **87**(XXX): p. XXX.
78. Benziger, C.P., A.L.P. Ribeiro, and J. Narulaz, *After 100 Years, the Diagnosis, Treatment, and Control of Chagas Disease Remains a Challenge*. GLOBAL HEART, 2015. **10**(3): p. 137-138.
79. PAHO/WHO, Rev Patol Trop, 1999. **28**: p. 247.
80. Filardi, L. and Z. Brener, *Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease*. . Trans R Soc Trop Med Hyg, 1987. **81**: p. 755-9.
81. Longo, D.L., *Chagas' Disease*. N Engl J Med, 2015. **373**: p. 456-66.
82. Viotti, R., B. Alarcón de Noya, and T. Araujo-Jorge, *Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**: p. 635-9.
83. Villar, J.C., J.G. Perez, and O.L. Cortes, *Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic Trypanosoma cruzi infection*. Cochrane Database Syst Rev 2014. **5**: p. CD003463.
84. Viotti, R., C. Vigliano, and B. Lococo, *Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial*. Ann Intern Med, 2006. **144**: p. 724-34.
85. Marín-Neto, J.A., A.J. Rassi, and A.A. Jr, *The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease*. . Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(Suppl 1): p. 319-24.
86. Castro, J.A., M. Montalto de Mecca, and L.C. Bartel, *Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis)*. Hum Exp Toxicol, 2006. **25**: p. 471-479.
87. Reimão, J.Q., et al., *Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of Leishmania (L.) infantum chagasi*. Exp Parasitol, 2012. **130**(3): p. 195-9.
88. Garnier, T., et al., *In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(4): p. 802-10.
89. Mäntylä, A., et al., *Synthesis, in vitro evaluation, and antileishmanial activity of water-soluble prodrugs of buparvaquone*. J Med Chem, 2004. **47**(1): p. 188-95.
90. Croft, S.L., et al., *The activity of hydroxynaphthoquinones against Leishmania donovani*. J Antimicrob Chemother, 1992. **30**(6): p. 827-32.
91. World-Health-Organization, *Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis*. World Health Organ Tech Rep Ser, 2012(975): p. v-xii, 1-100.

92. Modabber, F., et al., *Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. Kinetoplastid Biol Dis*, 2007. **6**: p. 3.
93. Hervás, J.A., et al., *Old world Leishmania infantum cutaneous leishmaniasis unresponsive to liposomal amphotericin B treated with topical imiquimod. Pediatr Infect Dis J*, 2012. **31**(1): p. 97-100.
94. Shamsi Meymandi, S., et al., *Comparative histological and immunohistochemical changes of dry type cutaneous leishmaniasis after administration of meglumine antimoniate, imiquimod or combination therapy. Arch Iran Med*, 2011. **14**(4): p. 238-43.
95. Khalili, G., et al., *Immunotherapy with Imiquimod increases the efficacy of Glucantime therapy of Leishmania major infection. Iran J Immunol*, 2011. **8**(1): p. 45-51.
96. El-On, J., E. Bazarsky, and R. Sneir, *Leishmania major: in vitro and in vivo anti-leishmanial activity of paromomycin ointment (Leshcutan) combined with the immunomodulator Imiquimod. Exp Parasitol*, 2007. **116**(2): p. 156-62.
97. Firooz, A., et al., *Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. Arch Dermatol*, 2006. **142**(12): p. 1575-9.
98. Shivahare, R., et al., *Combination of liposomal CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine induces strong cell-mediated immunity during experimental visceral leishmaniasis. PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94596.
99. Gupta, S., et al., *CpG oligodeoxynucleotide 2006 and miltefosine, a potential combination for treatment of experimental visceral leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother*, 2011. **55**(7): p. 3461-4.
100. Collier, M.A., et al., *Delivery of host cell-directed therapeutics for intracellular pathogen clearance. Expert Rev Anti Infect Ther*, 2013. **11**(11): p. 1225-35.
101. Hansch, C., et al., *Correlation of biological activity of phenoxyacetic acids with Hammett substituent constants and partition coefficients. 1962.*
102. Cherkasov, A., et al., *QSAR modeling: where have you been? Where are you going to? J Med Chem*, 2014. **57**(12): p. 4977-5010 %M 24351051 %2 PMC4074254.
103. Cramer, R.D., *The inevitable QSAR renaissance. Journal of computer-aided molecular design*, 2012. **26**(1): p. 35-38.
104. OECD, *Guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] Models, ENV/JM/MONO(2007)2, in OECD Environment Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No. 69, JT03224782, 154 pag. 2007, Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC): Paris. p. 154.*
105. Sanches, S.M. and C.A. Taft, *A molecular modeling and QSAR study of suppressors of the growth of Trypanosoma cruzi epimastigotes. Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2004. **23**(1): p. 89-97.
106. Alberto Castillo-Garit, J., et al., *A review of QSAR studies to discover new drug-like compounds actives against leishmaniasis and trypanosomiasis. Current topics in medicinal chemistry*, 2012. **12**(8): p. 852-865.
107. Kar, S. and K. Roy, *First report on predictive chemometric modeling, 3D-toxicophore mapping and in silico screening of in vitro basal cytotoxicity of diverse organic chemicals. Toxicology in Vitro*, 2013. **27**(2): p. 597-608.

Referencias

108. Konova, V., et al., *Virtual screening of chemical compounds active against breast cancer cell lines based on cell cycle modelling, prediction of cytotoxicity and interaction with targets*. SAR and QSAR in Environmental Research, 2015. **26**(7-9): p. 595-604.
109. Kirchmair, J., et al., *Predicting drug metabolism: experiment and/or computation?* Nature Reviews Drug Discovery, 2015. **14**(6): p. 387-404.
110. Liu, R., P. Schyman, and A. Wallqvist, *Critically Assessing the Predictive Power of QSAR Models for Human Liver Microsomal Stability*. Journal of chemical information and modeling, 2015. **55**(8): p. 1566-1575.
111. Álvarez, I.G., M.Á.C. Pérez, and M.d.V.B. Sanz, *Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos*. 2015: Universidad Miguel Hernández.
112. Atobe, T., et al., *Artificial neural network analysis for predicting human percutaneous absorption taking account of vehicle properties*. The Journal of toxicological sciences, 2015. **40**(2): p. 277-294.
113. Torres Silva, F. and G. HG Trossini, *The survey of the use of QSAR methods to determine intestinal absorption and oral bioavailability during drug design*. Medicinal Chemistry, 2014. **10**(5): p. 441-448.
114. Bessems, J.G., et al., *PBTK modelling platforms and parameter estimation tools to enable animal-free risk assessment: recommendations from a joint EPAA–EURL ECVAM ADME workshop*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2014. **68**(1): p. 119-139.
115. Iyer, M., et al., *Predicting blood–brain barrier partitioning of organic molecules using membrane–interaction QSAR analysis*. Pharmaceutical research, 2002. **19**(11): p. 1611-1621.
116. Bujak, R., et al., *Blood–brain barrier permeability mechanisms in view of quantitative structure–activity relationships (QSAR)*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2015. **108**: p. 29-37.
117. Carpenter, T.S., et al., *A method to predict blood-brain barrier permeability of drug-like compounds using molecular dynamics simulations*. Biophysical journal, 2014. **107**(3): p. 630-641.
118. Srivastav, V. and M. Tiwari, *k-nearest neighbor molecular field analysis based 3D-QSAR and in silico ADME/T studies of cinnamoyl derivatives as HIV-1 integrase inhibitors*. Medicinal Chemistry Research, 2015. **24**(2): p. 684-700.
119. Nigsch, F., et al., *Computational toxicology: an overview of the sources of data and of modelling methods*. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2009. **5**(1): p. 1-14.
120. Valerio, L.G., *In silico toxicology for the pharmaceutical sciences*. Toxicology and applied pharmacology, 2009. **241**(3): p. 356-370.
121. Rusyn, I., et al., *Predictive modeling of chemical hazard by integrating numerical descriptors of chemical structures and short-term toxicity assay data*. Toxicological Sciences, 2012: p. kfs095.
122. Wang, W., et al., *Developing Enhanced Blood–Brain Barrier Permeability Models: Integrating External Bio-Assay Data in QSAR Modeling*. Pharmaceutical research, 2015. **32**(9): p. 3055-3065.
123. Pradeep, P., *Hybrid Computational Toxicology Models for Regulatory Risk Assessment*. 2015.
124. Zhu, X.W., A. Sedykh, and S.S. Liu, *Hybrid in silico models for drug-induced liver injury using chemical descriptors and in vitro cell-imaging information*. Journal of Applied Toxicology, 2014. **34**(3): p. 281-288.

125. Oksel, C., C.Y. Ma, and X.Z. Wang, *Current situation on the availability of nanostructure-biological activity data*. SAR QSAR Environ Res, 2015. **26**(2): p. 79-94.
126. Marchese Robinson, R.L., et al., *An ISA-TAB-Nano based data collection framework to support data-driven modelling of nanotoxicology*. Beilstein J Nanotechnol, 2015. **6**: p. 1978-99.
127. Saad, S.M., et al., *4-Arylamino-6-nitroquinazolines: Synthesis and their activities against neglected disease leishmaniasis*. Eur J Med Chem, 2015. **108**: p. 13-20.
128. Pinto, E.G., et al., *Potential of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinones against Leishmania (L.) infantum: biological activity and structure-activity relationships*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e105127.
129. Rodrigues-Santos, C.E., et al., *Synthesis, antileishmanial activity and structure-activity relationship of 1-N-X-phenyl-3-N'-Y-phenyl-benzamidines*. Eur J Med Chem, 2013. **67**: p. 166-74.
130. Olah, M., et al., *WOMBAT: World of Molecular Bioactivity.*, in *Chemoinformatics in Drug DiscoVery*. 2005, Wiley-VCH: New York. p. 223-239.
131. Olah, M., et al., *WOMBAT and WOMBAT-PK: Bioactivity Databases for Lead and Drug Discovery.*, in *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design*. 2007, Wiley: Weinheim: Germany. p. 760-786.
132. Young, D., et al., *Are the chemical structures in your QSAR correct?* QSAR & Combinatorial Science, 2008. **27**(11-12): p. 1337-1345.
133. Tropsha, A., *Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation*. Molecular Informatics, 2010. **29**: p. 476-488.
134. Fourches, D., E. Muratov, and A. Tropsha, *Trust, but verify: on the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research*. J Chem Inf Model, 2010. **50**(7): p. 1189-204 %M 20572635 %2 PMC2989419.
135. Alexander, D.L.J., A. Tropsha, and D.A. Winkler, *Beware of R(2): Simple, Unambiguous Assessment of the Prediction Accuracy of QSAR and QSPR Models*. J Chem Inf Model, 2015. **55**(7): p. 1316-22.
136. Martin, T.M., et al., *Does rational selection of training and test sets improve the outcome of QSAR modeling?* J Chem Inf Model, 2012. **52**(10): p. 2570-8.
137. Sheridan, R.P., *Time-Split Cross-Validation as a Method for Estimating the Goodness of Prospective Prediction*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2013. **53**(4): p. 783-790.
138. Andrew, R.L. and J.G. Valerie, *Chapter 3: Molecular Descriptors. In: An Introduction to Chemoinformatics*. 2007, Dordrecht, The Netherlands: Springer. 53-74.
139. Todeschini, R. and V. Consonni, *Handbook of molecular descriptors*. Vol. 11. 2008: John Wiley & Sons.
140. Talete_srl, *DRAGON (Software for Molecular Descriptor Calculation), Version 6.0*. 2010: <http://www.talete.mi.it/>.
141. Zhu, H., et al., *Combinatorial QSAR modeling of chemical toxicants tested against Tetrahymena pyriformis*. Journal of chemical information and modeling, 2008. **48**(4): p. 766-784.
142. Tetko, I.V., et al., *Critical assessment of QSAR models of environmental toxicity against Tetrahymena pyriformis: focusing on applicability domain and overfitting by variable selection*. Journal of chemical information and modeling, 2008. **48**(9): p. 1733-1746.

Referencias

143. Todeschini, R. and V. Consonni, *Molecular Descriptors for Chemoinformatics, Volume 41 (2 Volume Set)*. Vol. 41. 2009: John Wiley & Sons.
144. Hu, Y., D. Stumpfe, and J. Bajorath, *Advancing the activity cliff concept*. F1000Res, 2013. **2**: p. 199 %M 24555097 %2 PMC3869489.
145. Maggiora, G.M., *On outliers and activity cliffs--why QSAR often disappoints*. J Chem Inf Model, 2006. **46**(4): p. 1535.
146. Stumpfe, D. and J. Bajorath, *Frequency of occurrence and potency range distribution of activity cliffs in bioactive compounds*. J Chem Inf Model, 2012. **52**(9): p. 2348-53 %M 22866827 %2.
147. Rogers, D. and M. Hahn, *Extended-connectivity fingerprints*. J Chem Inf Model, 2010. **50**(5): p. 742-54.
148. Stumpfe, D., et al., *Recent progress in understanding activity cliffs and their utility in medicinal chemistry*. J Med Chem, 2014. **57**(1): p. 18-28.
149. Golbraikh, A., et al., *Data set modelability by QSAR*. J Chem Inf Model, 2014. **54**(1): p. 1-4 %M 24251851 %2 PMC3984298.
150. Prism, G., *version 5.01*. GraphPad Software Inc.: San Diego, CA, USA, 2007.
151. Balfer, J. and J. Bajorath, *Systematic Artifacts in Support Vector Regression-Based Compound Potency Prediction Revealed by Statistical and Activity Landscape Analysis*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0119301.
152. Ramayah, T., et al., *Discriminant analysis: An illustrated example*. African journal of business management, 2010. **4**(9): p. 1654-1667.
153. Stat_Soft_Inc., *STATISTICA (data analysis software system), version 8.0*. 2007: www.statsoft.com.
154. McRoberts, R.E., E. Næsset, and T. Gobakken, *Optimizing the k-Nearest Neighbors technique for estimating forest aboveground biomass using airborne laser scanning data*. Remote Sensing of Environment, 2015. **163**: p. 13-22.
155. McRoberts, R.E., M.D. Nelson, and D.G. Wendt, *Stratified estimation of forest area using satellite imagery, inventory data, and the k-Nearest Neighbors technique*. Remote Sensing of Environment, 2002. **82**(2): p. 457-468.
156. Beyer, K., et al., *When Is "Nearest Neighbor" Meaningful?* 1999.
157. Bellman, R., et al., *Adaptive control processes: a guided tour*. Vol. 4. 1961: Princeton university press Princeton.
158. Schreck, T., T. Seidl, and D. Keim. *Subspace Nearest Neighbor Search-Problem Statement, Approaches, and Discussion*. in *Similarity Search and Applications: 8th International Conference, SISAP 2015, Glasgow, UK, October 12-14, 2015, Proceedings*. 2015. Springer.
159. Powers, D.M., *Evaluation: from precision, recall and F-measure to ROC, informedness, markedness and correlation*. 2011.
160. Wikipedia. *Sensitivity and specificity*. 2016 21 December 2015, at 07:55. [cited 2016 21 Enero, 2016]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Sensitivity_and_specificity.
161. Matthews, B.W., *Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1975. **405**(2): p. 442-451.
162. Brown, M.T. and L.R. Wicker, *Discriminant analysis*. 2000.
163. Machado Tugores, Y., *Tamizaje farmacológico en la búsqueda de potenciales fármacos antimaláricos integrando nuevos modelos in silico y corroboración experimental.*, in

- Departamento de Parasitología*. 2013, Universidad Complutense de Madrid: Madrid. p. 137.
164. Kuncheva, L.I., *Combining Pattern Classifiers: Methods and Algorithms*. 2004, Hoboken, New Jersey, USA: Wiley Interscience. John Wiley & Sons, Inc.
165. Polikar, R., *Ensemble based systems in decision making*. Circuits and Systems Magazine, IEEE, 2006. **6**(3): p. 21-45.
166. Kuncheva, L.I. and C.J. Whitaker, *Measures of diversity in classifier ensembles and their relationship with the ensemble accuracy*. Machine learning, 2003. **51**(2): p. 181-207.
167. Planche, A.S., et al., *Designing novel antitrypanosomal agents from a mixed graph-theoretical substructural approach*. J Comput Chem, 2010. **31**(4): p. 882-94.
168. Bayes, T. and R. Price, *An Essay towards Solving a Problem in the Doctrine of Chances*. Philosophical Transactions (1683-1775), 1763. **53**: p. 370-418.
169. Wikipedia. *Bayes' theorem*. 2015 20 Nov 2015 [cited 2015 30 Nov]; Available from: https://en.wikipedia.org/wiki/Bayes%27_theorem.
170. McGrayne, S.B., *The theory that would not die : how Bayes' rule cracked the Enigma code, hunted down Russian submarines, & emerged triumphant from two centuries of controversy*. [New ed.]. ed. 2012, New Haven ; London: Yale University Press. xvi, 336 p. ; 24 cm.
171. Bellera, C.L., et al., *Identification of levothyroxine antichagasic activity through computer-aided drug repurposing*. The Scientific World Journal, 2014. **2014**.
172. Triballeau, N., et al., *Virtual screening workflow development guided by the "receiver operating characteristic" curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4*. J Med Chem, 2005. **48**(7): p. 2534-2547.
173. Jaworska, J.S., et al., *Summary of a workshop on regulatory acceptance of (Q) SARs for human health and environmental endpoints*. Environmental Health Perspectives, 2003. **111**(10): p. 1358.
174. Gramatica, P., *Principles of QSAR models validation: internal and external*. QSAR and Combinatorial Science, 2007. **26**(5): p. 694.
175. Netzeva, T.I., et al., *Current status of methods for defining the applicability domain of (quantitative) structure-activity relationships. The report and recommendations of ECVAM Workshop 52*. Altern Lab Anim, 2005. **33**(2): p. 155-73.
176. Jaworska, J., N. Nikolova-Jeliazkova, and T. Aldenberg, *QSAR applicabilty domain estimation by projection of the training set descriptor space: a review*. Alternatives to laboratory animals: ATLA, 2005. **33**(5): p. 445.
177. Nikolova-Jeliazkova, N. and J. Jaworska, *An approach to determining applicability domains for QSAR group contribution models: an analysis of SRC KOWWIN*. Alternatives to laboratory animals: ATLA, 2005. **33**(5): p. 461-470.
178. Jeliazkova, N. and V. Jeliazkov, *AMBIT RESTful web services: an implementation of the OpenTox application programming interface*. J. Cheminformatics, 2011. **3**: p. 18.
179. Jeliazkova, N. and J. Jaworska, *AMBIT Discovery- Software for Applicability Domain Assessment*. Version 0.04. 2006: http://ambit.sourceforge.net/download_ambitdiscovery.html.
180. Sharlow, E.R., et al., *Identification of potent chemotypes targeting Leishmania major using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen*. PLoS Negl Trop Dis, 2009. **3**(11): p. e540.

Referencias

181. Broad_Institute, *Luminescence Cell-Based/Microorganism Primary HTS to Identify Inhibitors of T. cruzi Replication*. NIH Molecular Libraries Probe Production Network. . 2009: Colectada 2009-07-22, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1885>
182. University_of_Pittsburgh_Molecular_Library_Screening_Center, *Leishmania major promastigote HTS - primary screen repeat 1 uM*. NIH Molecular Libraries Screening Center., University_of_Pittsburgh_Molecular_Library_Screening_Center, Editor. 2008: PubChem Bioassay, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1258>, **Colectata 29/02/2008**, Accedida 09/02/2013..
183. University_of_Pittsburgh_Molecular_Library_Screening_Center, *Leishmania major promastigote HTS*. NIH Molecular Libraries Screening Center. 2008: PubChem Bioassay, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=1063>, Colectata 29/02/2008, Accedida 09/02/2013.
184. Desai, P.V., et al., *Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors by use of virtual screening. 2. The available chemical directory*. J Med Chem, 2006. **49**(5): p. 1576-84.
185. Desai, P.V., et al., *Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge database*. J Med Chem, 2004. **47**(26): p. 6609-15.
186. Venkatesan, S.K. and V.K. Dubey, *Footprinting of inhibitor interactions of in silico identified inhibitors of trypanothione reductase of Leishmania parasite*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 963658.
187. Venkatesan, R., et al., *High resolution crystal structures of triosephosphate isomerase complexed with its suicide inhibitors: the conformational flexibility of the catalytic glutamate in its closed, liganded active site*. Protein Sci, 2011. **20**(8): p. 1387-97.
188. Villalobos-Rocha, J.C., et al., *Anti-Trypanosoma cruzi and anti-leishmanial activity by quinoxaline-7-carboxylate 1,4-di-N-oxide derivatives*. Parasitol Res, 2014. **113**(6): p. 2027-35 %M 24691716 %2.
189. Chandrasekaran, S., et al., *Exploring the inhibitory activity of Withaferin-A against Pteridine reductase-1 of L. donovani*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2015: p. 1-9.
190. Bernal, F.A. and E. Coy-Barrera, *In-silico analyses of sesquiterpene-related compounds on selected Leishmania enzyme-based targets*. Molecules, 2014. **19**(5): p. 5550-69 %M 24786692 %2.
191. Dube, D., et al., *3D-QSAR based pharmacophore modeling and virtual screening for identification of novel pteridine reductase inhibitors*. J Mol Model, 2012. **18**(5): p. 1701-11.
192. Kaur, J., T. Kaur, and S. Kaur, *Studies on the protective efficacy and immunogenicity of Hsp70 and Hsp83 based vaccine formulations in Leishmania donovani infected BALB/c mice*. Acta Trop, 2011. **119**(1): p. 50-6.
193. Passalacqua, T.G., et al., *Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds*. Bioorg Med Chem Lett, 2015. **25**(16): p. 3342-5 %M 26055530 %2.
194. García-Alzate, R., et al., *Triatoma maculata, the Vector of Trypanosoma cruzi, in Venezuela. Phenotypic and Genotypic Variability as Potential Indicator of Vector Displacement into the Domestic Habitat*. Front Public Health, 2014. **2**: p. 170.
195. Koehler, M.G., K. Rowberg-Schaefer, and A.J. Hopfinger, *A molecular shape analysis and quantitative structure-activity relationship investigation of some triazine-antifolate*

- inhibitors of Leishmania dihydrofolate reductase*. Arch Biochem Biophys, 1988. **266**(1): p. 152-61.
196. Booth, R.G., et al., *Quantitative structure-activity relationship of triazine-antifolate inhibition of Leishmania dihydrofolate reductase and cell growth*. J Med Chem, 1987. **30**(7): p. 1218-24.
197. Pizzo, C., et al., *Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against Trypanosoma Cruzi*. Chem Biol Drug Des, 2011. **77**(3): p. 166-72.
198. Trossini, G.H.G., et al., *Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from Trypanosoma cruzi: molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies*. Journal, 2009. **28**(1): p. 3-11.
199. Guido, R.V.C., et al., *Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from Trypanosoma cruzi*. Journal, 2008. **23**(6): p. 964-73.
200. de Paula da Silva, C.H.T., et al., *Novel aryl β -aminocarbonyl derivatives as inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase: binding mode revised by docking and GRIND2-based 3D-QSAR procedures*. J Biomol Struct Dyn, 2012. **29**(6): p. 702-16.
201. da Rocha Pita, S.S., et al., *Receptor-dependent 4D-QSAR analysis of peptidemimetic inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase with receptor-based alignment*. Chem Biol Drug Des, 2012. **79**(5): p. 740-8.
202. Iribarne, F., et al., *Assaying phenothiazine derivatives as trypanothione reductase and glutathione reductase inhibitors by theoretical docking and molecular dynamics studies*. Journal, 2009. **28**(4): p. 371-81.
203. Schormann, N., et al., *Structure-based approach to pharmacophore identification, in silico screening, and three-dimensional quantitative structure-activity relationship studies for inhibitors of Trypanosoma cruzi dihydrofolate reductase function*. Journal, 2008. **73**(4): p. 889-901.
204. Castillo-Garit, J.A., et al., *Identification in silico and in vitro of novel trypanosomicidal drug-like compounds*. Chem Biol Drug Des, 2012. **80**(1): p. 38-45.
205. Castillo-Garit, J.A., et al., *Computational discovery of novel trypanosomicidal drug-like chemicals by using bond-based non-stochastic and stochastic quadratic maps and linear discriminant analysis*. Eur J Pharm Sci, 2010. **39**(1-3): p. 30-6.
206. Pérez-Montoto, L.G., L. Santana, and H. González-Díaz, *Scoring function for DNA-drug docking of anticancer and antiparasitic compounds based on spectral moments of 2D lattice graphs for molecular dynamics trajectories*. Eur J Med Chem, 2009. **44**(11): p. 4461-9.
207. Prieto, J.J., A. Talevi, and L.E. Bruno-Blanch, *Application of linear discriminant analysis in the virtual screening of antichagasic drugs through trypanothione reductase inhibition*. Mol Divers, 2006. **10**(3): p. 361-75.
208. ChemAxonLtd., *JChem Standardizer, Version 6.1.0*. 2013: <http://www.chemaxon.com/products/standardizer>.
209. Yap, C.W., *PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints*. Journal of computational chemistry, 2011. **32**(7): p. 1466-1474.
210. Yap, C.W., *Pharmaceutical Data Exploratory Laboratory, Version 2.17*. 2010: <http://padel.nus.edu.sg>.

Referencias

211. ChemAxonLtd, *JChem for Excel, Version 6.1.3.739, Copyright 2008-2013* 2013: <http://www.chemaxon.com/>.
212. Meneses-Gómez, M., *DASDE: Diversity Analysis, Selection and Discovery of Best Ensemble from Base Models*. 2015, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas: Cuba.
213. Selleck_Chemicals, *Bioactive Screening Libraries*. 2013: <http://www.selleckchem.com/>.
214. Alfonso-Orta, I., et al., *Formulario Nacional de Medicamentos, República de Cuba, Ministerio de Salud Pública,* Editor. 2014: <http://fnmedicamentos.sld.cu/index.php?P=Home>.
215. Thomson and Reuters, *Derwent drug file. Thesaurus Part 3 Appendices*. 2004, Thomson Scientific: 14 Great Queen Street, London WC2B 5DF, United Kingdom, t <http://www.thomson.com/scientific>.
216. Matthews, E.J., et al., *Assessment of the health effects of chemicals in humans: I. QSAR estimation of the maximum recommended therapeutic dose (MRTD) and no effect level (NOEL) of organic chemicals based on clinical trial data*. *Curr Drug Discov Technol*, 2004. **1**(1): p. 61-76 %M 16472220 %2 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472220> %@ 1570-1638.
217. Ekins, S., et al., *Enhancing hit identification in Mycobacterium tuberculosis drug discovery using validated dual-event Bayesian models*. *PLoS One*, 2013. **8**(5): p. e63240 %M 23667592 %2 PMC3647004.
218. Knox, C., et al., *DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D1035-41 %M 21059682 %2 PMC3013709.
219. Broad_Institute, *Luminescence Cell-Based/Microorganism Dose Confirmation HTS to Identify Inhibitors of T. cruzi Replication*. *Colectada* 2009-10-27, . 2009: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?aid=2044>.
220. Varmuza, K., P. Filzmoser, and M. Dehmer, *Multivariate linear QSPR/QSAR models: Rigorous evaluation of variable selection for PLS*. *Comput Struct Biotechnol J*, 2013. **5**: p. e201302007.
221. Bodley, A.L., M.W. McGarry, and T.A. Shapiro, *Drug cytotoxicity assay for African trypanosomes and Leishmania species*. *J Infect Dis*, 1995. **172**(4): p. 1157-9.
222. Holford, N. and L. Sheiner, *Understanding the dose-effect relationship: clinical application of pharmacokinetic-pharmacodynamic models*. *Clin Pharmacokinet*, 1981. **6**: p. 429-453.
223. Lorente, S.O., et al., *Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(8): p. 2937-50.
224. Frisch, M.J., et al., *Gaussian 09*. 2009, Gaussian, Inc. %! Gaussian 09: Wallingford, CT, USA.
225. Haywood, J., et al., *Council for International Organization of Medical Sciences & The International Council for Laboratory Animal Science. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals*. 2012.
226. Buffet, P., et al., *Culture microtitration a sensitive method for quantifying Leishmania infantum in tissues of infected mice*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995. **39**: p. 2167-8.
227. Murray, H.W., J. Hariprashad, and R.E. Fichtl, *Models of relapse of experimental visceral leishmaniasis*. *J Infect Dis*, 1996. **173**(4): p. 1041-3.

228. Buckner, F., et al., *Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase*. Antimicrob Agents Chemother, 1996. **40**: p. 2592-2597.
229. Schmidt, T.J., et al., *Quantitative structure-antiprotozoal activity relationships of sesquiterpene lactones*. Molecules, 2009. **14**(6): p. 2062-2076.
230. Martinez-Rojano, H., et al., *Activity of hydroxyurea against Leishmania mexicana*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(10): p. 3642-7.
231. Melo, E.J. and H.J. Beiral, *Effect of hydroxyurea on the intracellular multiplication of Toxoplasma gondii, Leishmania amazonensis and Trypanosoma cruzi*. Braz J Med Biol Res, 2003. **36**(1): p. 65-9.
232. Vercesi, A.E., et al., *Regulation of intracellular calcium homeostasis in Trypanosoma cruzi. Effects of calmidazolium and trifluoperazine*. Cell Calcium, 1991. **12**(5): p. 361-9.
233. Lacuara, J.L., et al., *Disruption of mitochondrial function as the basis of the trypanocidal effect of trifluoperazine on Trypanosoma cruzi*. Experientia, 1991. **47**(6): p. 612-6.
234. Lammel, E.M., et al., *Trypanosoma cruzi: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation*. Exp Parasitol, 1996. **83**(2): p. 240-9.
235. Yakubu, M.A., S. Majumder, and F. Kierszenbaum, *Changes in Trypanosoma cruzi infectivity by treatments that affect calcium ion levels*. Mol Biochem Parasitol, 1994. **66**(1): p. 119-25.
236. Scholz, T., et al., *Chemical, biochemical and microbiological properties of a brominated nitrovinylfuran with broad-spectrum antibacterial activity*. Bioorg Med Chem Lett, 2013. **21**: p. 795-804.
237. Lo Presti, M.S., et al., *Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease*. 2015. **145**: p. 79-87.
238. Bustamante, J.M., et al., *Treatment with benznidazole or thioridazine in the chronic phase of experimental Chagas disease improves cardiopathy*. 2007. **29**(6): p. 733-7.
239. Lo Presti, M.S., et al., *Thioridazine treatment prevents cardiopathy in Trypanosoma cruzi infected mice*. 2004. p. 634-6.
240. Rivarola, H.W., et al., *Thioridazine treatment modifies the evolution of Trypanosoma cruzi infection in mice*. 1999. **93**(7): p. 695-702.
241. Paglini-Oliva, P., et al., *Structural, ultrastructural studies and evolution of Trypanosoma cruzi-infected mice treated with thioridazine*. 1998. **65**(2): p. 78-86.
242. Lange, I.E.S., et al., *Evaluation of the Anti-Trypanosoma cruzi Effects of the Antipsychotic Drug Levomepromazine*. International Journal of Clinical Medicine, 2012. **3**(05): p. 344.
243. Cruz-Monteagudo, M., et al., *Activity cliffs in drug discovery: Dr Jekyll or Mr Hyde?* Drug Discov Today, 2014. **19**(8): p. 1069-80 %M 24560935 %2.
244. Stumpfe, D. and J. Bajorath, *Exploring activity cliffs in medicinal chemistry*. J Med Chem, 2012. **55**(7): p. 2932-42 %M 22236250 %2.
245. Gaulton, A., et al., *ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D1100-7 %M 21948594 %2 PMC3245175.
246. Meneses-Marcel, A., et al., *New antitrichomonal drug-like chemicals selected by bond (edge)-based TOMOCOMD-CARDD descriptors*. J Biomol Screen, 2008. **13**: p. 785-794.

Referencias

247. Fonseca Berzal, C.R., *Búsqueda y Optimización de Potenciales Alternativas Terapéuticas para el Tratamiento de la Enfermedad de Chagas.*, in *Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia*. 2016, Universidad Complutense de Madrid: Madrid. p. 376.
248. Tugores, Y.M., et al. *Discovery of new antimalarials from commercial drugs by in silico and in vitro screening/ Descubrimiento de nuevos antimaláricos a partir de fármacos conocidos mediante cribado in silico e in vitro.* in *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 2012.
249. Ghose, A.K., V.N. Viswanadhan, and J.J. Wendoloski, *Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: an analysis of ALOGP and CLOGP methods.* The Journal of Physical Chemistry A, 1998. **102**(21): p. 3762-3772.
250. Mears, E.R., et al., *A review: The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous Leishmaniasis.* PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(9): p. e0003889.
251. Sacks, D.L. and P.V. Perkins, *Identification of an infective stage of Leishmania promastigotes.* Science, 1984. **223**(4643): p. 1417-9.
252. Nasiri, V., et al., *Effects of sheep and mouse urine on the growth pattern of Leishmania major promastigotes.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 748592.
253. Ladopoulos, T., et al., *The proliferation potential of promastigotes of the main Leishmania species of the old world in NNN culture medium prepared using blood of four different mammals.* Exp Parasitol, 2015. **157**: p. 124-7.
254. Castelli, G., et al., *Evaluation of two modified culture media for Leishmania infantum cultivation versus different culture media.* J Parasitol, 2014. **100**(2): p. 228-30.
255. Bodley, A.L., et al., *Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs. Structure-activity correlations.* Biochem Pharmacol, 1995. **50**(7): p. 937-42.
256. Papadopoulou, M.V., et al., *Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based piperazines and 2-amino-1,3-benzothiazoles as antichagasic agents.* Bioorg Med Chem, 2013. **21**(1).
257. Miguel, D.C., et al., *Tamoxifen is effective against Leishmania and induces a rapid alkalization of parasitophorous vacuoles harbouring Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigotes.* J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(3): p. 526-34.
258. Eissa, M.M., E.I. Amer, and S.M. El Sawy, *Leishmania major: activity of tamoxifen against experimental cutaneous leishmaniasis.* Exp Parasitol, 2011. **128**(4): p. 382-90.
259. Miguel, D.C., J.K. Yokoyama-Yasunaka, and S.R. Uliana, *Tamoxifen is effective in the treatment of Leishmania amazonensis infections in mice.* PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(6): p. e249.
260. Miguel, D.C., et al., *Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of Leishmania braziliensis and Leishmania chagasi infections.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009. **63**: p. 365-368.
261. Miguel, D.C., et al., *The anticancer drug tamoxifen is active against Trypanosoma cruzi in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009. **63**: p. 365-368.
262. Miguel, D.C., et al., *Clinical isolates of New World Leishmania from cutaneous and visceral leishmaniasis patients are uniformly sensitive to tamoxifen.* Int J Antimicrob Agents, 2011. **38**(1): p. 93-4.
263. Reimão, J.Q., et al., *Antileishmanial activity of the estrogen receptor modulator raloxifene.* PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(5): p. e2842 %M 24810565 %2 PMC4014391.

264. Bonano, V.I., et al., *Discovery of synthetic Leishmania inhibitors by screening of a 2-arylbenzothiophene library*. Chem Biol Drug Des, 2014. **83**(3): p. 289-96 %M 24119198 %2.
265. EPA. *US Environmental Protection Agency. Distributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database: Maximum Recommended Daily Doses*. 2008 May 2, 2016 [cited 2016 10/5/2016]; Available from: http://www.epa.gov/ncct/dsstox/sdf_fdamdd.html#DownloadTable.
266. Reagan-Shaw, S., M. Nihal, and N. Ahmad, *Dose translation from animal to human studies revisited*. FASEB J, 2008. **22**(3): p. 659-61 %M 17942826 %2.
267. Koh, S., et al., *A novel light-dependent selection marker system in plants*. Plant Biotechnol J, 2011. **9**(3): p. 348-58.
268. MING, H., et al., *Experimental study of toxoflavin on human non-small cell lung cancer cells A549*. Chinese Clinical Oncology, 2016. **21**(2): p. 117-120
269. Wang, S., et al., *Study on glycosylated prodrugs of toxoflavins for antibody-directed enzyme tumor therapy*. Carbohydr Res, 2007. **342**(9): p. 1254-60.
270. Baell, J.B. and G.A. Holloway, *New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays*. J Med Chem, 2010. **53**(7): p. 2719-40.
271. Baell, J.B., *Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS)*. J Nat Prod, 2016. **79**(3): p. 616-28.
272. Baell, J.B., *Screening-based translation of public research encounters painful problems*. ACS medicinal chemistry letters, 2015. **6**(3): p. 229-234.
273. Latuasan, H.E. and W. Berends, *On the origin of the toxicity of toxoflavin*. Biochimica et Biophysica Acta, 1961. **52**(3): p. 502-508.
274. Simeonov, A., et al., *Fluorescence spectroscopic profiling of compound libraries*. J Med Chem, 2008. **51**(8): p. 2363-71.
275. Huryn, D.M. and A.B. Smith, *The identification, characterization and optimization of small molecule probes of cysteine proteases: experiences of the Penn Center for Molecular Discovery with cathepsin B and cathepsin L*. Curr Top Med Chem, 2009. **9**(13): p. 1206-16.
276. Gründer, G., H. Hippus, and A. Carlsson, *The 'atypicality' of antipsychotics: a concept re-examined and re-defined*. Nature Reviews Drug Discovery, 2009. **8**(3): p. 197-202.
277. Guzmán, F. *Antipsicóticos típicos, neurolépticos o de primera generación*. 2016 May 12, 2016]; Available from: <http://institutedepsicofarmacologia.com/antipsicoticos/tipicos-neurolepticos-convencionales-primera-generacion>.
278. Martindale, J., *The Extra Pharmacopoeia*. 30th ed. 1993, London: The Pharmaceutical Press. 618.
279. Essodaïgui, M., et al., *Energy-dependent efflux from Leishmania promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps*. Mol Biochem Parasitol, 1999. **100**(1): p. 73-84.
280. Abbate, E., et al., *Successful alternative treatment of extensively drug-resistant tuberculosis in Argentina with a combination of linezolid, moxifloxacin and thioridazine*. J Antimicrob Chemother, 2012. **67**(2): p. 473-7.
281. van Soolingen, D., et al., *The antipsychotic thioridazine shows promising therapeutic activity in a mouse model of multidrug-resistant tuberculosis*. PLoS One, 2010. **5**(9).

Referencias

282. Thanacoody, H.K.R., *Thioridazine: resurrection as an antimicrobial agent?* Br J Clin Pharmacol, 2007. **64**(5): p. 566-74.
283. Dutta, N.K., M.L. Pinn, and P.C. Karakousis, *Reduced emergence of isoniazid resistance with concurrent use of thioridazine against acute murine tuberculosis.* Antimicrobial agents and chemotherapy, 2014. **58**(7): p. 4048-4053.
284. Ordway, D., et al., *Clinical concentrations of thioridazine kill intracellular multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(3): p. 917-22.
285. Gutierrez-Correa, J., A.H. Fairlamb, and A.O. Stoppani, *Trypanosoma cruzi trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals.* Free radical research, 2001. **34**(4): p. 363-378.
286. Gutiérrez-Correa, J., *Trypanosoma cruzi dihydrolipoamide dehydrogenase as target for phenothiazine cationic radicals. Effect of antioxidants.* Curr Drug Targets, 2006. **7**(9): p. 1155-79.
287. Rivarola, H.W. and P.A. Paglini-Oliva, *Trypanosoma cruzi trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution.* 2002. p. 43-52.
288. Yang, S.-Y., et al., *Risk of extrapyramidal syndrome in schizophrenic patients treated with antipsychotics: a population-based study.* Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(4): p. 586-94.
289. Harrigan, E.P., et al., *A randomized evaluation of the effects of six antipsychotic agents on QTc, in the absence and presence of metabolic inhibition.* Journal of clinical psychopharmacology, 2004. **24**(1): p. 62-69.
290. Reilly, J., et al., *QTc-interval abnormalities and psychotropic drug therapy in psychiatric patients.* The Lancet, 2000. **355**(9209): p. 1048-1052.
291. Blondeau, J.M., et al., *In vitro evaluation of G1: a novel antimicrobial compound.* Int J Antimicrob Agents, 1999. **11**(2): p. 163-6.
292. Peltason, L., Y. Hu, and J. Bajorath, *From structure-activity to structure-selectivity relationships: quantitative assessment, selectivity cliffs, and key compounds.* ChemMedChem, 2009. **4**(11): p. 1864-73.
293. Vermeersch, M., et al., *In vitro susceptibilities of Leishmania donovani promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences.* Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3855-9.
294. Hazra, S., et al., *Antileishmanial activity of cryptolepine analogues and apoptotic effects of 2,7-dibromocryptolepine against Leishmania donovani promastigotes.* Parasitol Res, 2012. **111**(1): p. 195-203.
295. Rocha, V.P., et al., *Activity of antimalarial drugs in vitro and in a murine model of cutaneous leishmaniasis.* J Med Microbiol, 2013. **62**(Pt 7): p. 1001-10.
296. Fabbretti, A., et al., *The antibiotic Furvina(R) targets the P-site of 30S ribosomal subunits and inhibits translation initiation displaying start codon bias.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(20): p. 10366-74.
297. Drobnica, L. and E. Sturdik, *Antimicrobial activity of 2-vinylfuran derivatives.* Folia Microbiol (Praha), 1980. **25**(6): p. 467-75.
298. Neuman, R.C.J., *Organic Chemistry.* University of California, Riverside. p. 35.
299. Li, W.Q., et al., *Design, synthesis and potent cytotoxic activity of novel podophyllotoxin derivatives.* Bioorg Med Chem Lett, 2013. **2013**(21): p. 2363-2369.

300. Guo, Y.E., et al., *Synthesis and antitumor activity of novel podophyllotoxin derivatives against multidrug-resistant cancer cells*. J Asian Nat Prod Res 2011. **13**: p. 417-424.
301. Ji, J., et al., *Analysis of T helper cell responses during infection with Leishmania amazonensis*. Am J Trop Med Hyg, 2002. **66**(4): p. 338-45.
302. Chan-Bacab, M.J., et al., *Variation of leishmanicidal activity in four populations of Urechites andrieuxii*. J Ethnopharmacol, 2003. **86**(2-3): p. 243-7.
303. Garcia, M., et al., *Effect of Bixa orellana against Leishmania amazonensis*. Forsch Komplementmed, 2011. **18**(6): p. 351-3.
304. Demarchi, I.G., et al., *Effect of HIV protease inhibitors on New World Leishmania*. Parasitol Int, 2012. **61**(4): p. 538-44.
305. Valadares, D.G., et al., *Therapeutic efficacy induced by the oral administration of Agaricus blazei Murill against Leishmania amazonensis*. Parasitol Res, 2012. **111**(4): p. 1807-16.
306. Uliana, S.R., *Animal Models of Leishmaniasis Applied to Drug Discovery*, in Sao Paulo School of Advanced Science on Neglected Diseases Drug Discovery – focus on Kinetoplastids (SPSAS-ND3). 2015: Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Sao Paulo, Brazil.
307. Mutiso, J.M., et al., *In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a combination therapy of diminazene and artesunate against Leishmania donovani in BALB/c mice*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2011. **53**(3): p. 129-32.
308. Al-Abdely, H.M., et al., *Efficacy of the triazole SCH 56592 against Leishmania amazonensis and Leishmania donovani in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(12): p. 2910-4.
309. Parra, M.G., et al., *Leishmanicidal activity of Echinaster (Othilia) echinophorus crude extract*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2010. **52**(2): p. 89-93.
310. Fuchino, H., et al., *A new leishmanicidal saponin from Brunfelsia grandiflora*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2008. **56**(1): p. 93-6.
311. Lima, C.B., et al., *A novel organotellurium compound (RT-01) as a new antileishmanial agent*. Korean J Parasitol, 2009. **47**(3): p. 213-8.
312. Ayres, D.C., et al., *Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2011. **53**(6): p. 329-34.
313. Reimao, J.Q., et al., *Parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected mice: validation of luciferase as a quantitative tool*. J Microbiol Methods, 2013. **93**(2): p. 95-101.
314. Wong, I.L.K., et al., *In vitro and in vivo efficacy of novel flavonoid dimers against cutaneous leishmaniasis*. Antimicrob Agents Chemother, 2014. **58**(6): p. 3379-88 %M 24687505 %2 PMC4068441.
315. Souza-Silva, F., et al., *Epoxy- α -lapachone has in vitro and in vivo anti-leishmania (Leishmania) amazonensis effects and inhibits serine proteinase activity in this parasite*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(4): p. 1910-8.
316. Serrano-Martin, X., et al., *Amiodarone and miltefosine act synergistically against Leishmania mexicana and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(12): p. 5108-13.

Referencias

317. Coutinho, S.G., C. Pirmez, and A.M. Da-Cruz, *Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002. **96 Suppl 1**: p. S173-8.
318. Coutinho, S.G., et al., *Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis*. Braz J Med Biol Res, 1998. **31**(1): p. 139-42.
319. Olliaro, P., et al., *Methodology of clinical trials aimed at assessing interventions for cutaneous leishmaniasis*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(3): p. e2130 %M 23556016 %2 PMC3605149.
320. Oster, C.N., et al., *American cutaneous leishmaniasis: a comparison of three sodium stibogluconate treatment schedules*. Am J Trop Med Hyg, 1985. **34**(5): p. 856-60.
321. Isaac-Marquez, A.P. and C.M. Lezama-Davila, *Detection of pathogenic bacteria in skin lesions of patients with chiclero's ulcer. Reluctant response to antimonial treatment*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2003. **98**(8): p. 1093-5.
322. AlSamarai, A.M. and H.S. AlObaidi, *Cutaneous leishmaniasis in Iraq*. J Infect Dev Ctries, 2009. **3**(2): p. 123-9.
323. Dagger, F., et al., *Regulatory volume decrease in Leishmania mexicana: effect of anti-microtubule drugs*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2013. **108**(1): p. 84-90.
324. Parveen, S., et al., *Antitrypanosomal, antileishmanial, and antimalarial activities of quaternary arylalkylammonium 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfides, a new class of trypanothione reductase inhibitor, and of N-acyl derivatives of 2-amino-4-chlorophenyl phenyl sulfide*. J Med Chem, 2005. **48**(25): p. 8087-97.
325. Gutiérrez-Correa, J., R.L. Krauth-Siegel, and A.O.M. Stoppani, *Phenothiazine radicals inactivate Trypanosoma cruzi dihydrolipoamide dehydrogenase: enzyme protection by radical scavengers*. 2003. p. 281-91.
326. Zilberstein, D. and D.M. Dwyer, *Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite Leishmania*. Science, 1984. **226**(4677): p. 977-9.
327. Hegenscheid, B. and H.W. Presber, *[Antiprotozoal effects of benzodiazepine derivatives]*. Angew Parasitol, 1990. **31**(4): p. 231-7.
328. Mukherjee, S., et al., *Imipramine exploits histone deacetylase 11 to increase the IL-12/IL-10 ratio in macrophages infected with antimony-resistant Leishmania donovani and clears organ parasites in experimental infection*. J Immunol, 2014. **193**(8): p. 4083-94 %M 25217162 %2.

L. ANEXOS

Anexo 1: Modelos de actividad anti-leishmanial según familias de descriptores DRAGON

Modelo	#Var	λ Wilks	CDM	Q_{prueba}	FAR_{prueba}	C_{prueba}	Función
1-Constitucionales	7	0.45	4.9	88.0	10	0.76	-10.26 -1.86Si +0.56nBO +0.71SCBO +2.92nH +2.08nX +0.13N% +0.33nCsp2
2-Anillos	3	0.66	2.1	76.6	21	0.53	-4.471 +0.13TRS +0.901nBnz +0.005D/Dtr06
3-Topológicos	6	0.49	4.2	85.8	11	0.72	-1.223 -0.508Dz +0.21Pol -33.063PW4 - 0.491MAXDP -0.14DELS +3.553Psi_e_0
4-Caminos y pasos	4	0.59	2.7	79.6	20	0.59	-7.314 +32.267MWC01 -0.422SRW05 - 29.448piPC01 +2.623PCD
5-Conectividad	6	0.54	3.4	83.8	14	0.68	-19.869 -1.201X0 +1.964X5 +104.347X4A +0.762X0v +13.738X1Per -10.594X1MulPer
6-Información	7	0.55	3.2	81.5	18	0.63	+12.6 -27.9AAC -1.2IVDE -3.5IC2 +17IC4 +26.9SIC3 +128.5BIC0 -110BIC4
7- Matriz-2D	10	0.42	5.5	89.7	8	0.79	+14 +1.7Ho_H2 -11.2SM3_H2 +20Ho_Dz(Z) - 20.2Ho_Dz(m) +6.5SpAbs_Dz(e) - 13.1SpPos_Dz(e) +287.1EE_B(e) - 151.2SM3_B(e) -89.4SM5_B(e) +113.5WiA_B(i)
8-Autocorrelaciones 2D	5	0.49	4.2	86.8	15	0.74	-8.933 +5.614ATS1m +7.396ATS5v -6.976ATS5s -0.563ATSC2m +2.311ATSC1v
9-Burden eigenvalues	5	0.50	3.9	84.6	18	0.69	-26.939 +3.534SpMax4_Bh(v) - 0.667SpMax1_Bh(s) -0.746SpMax2_Bh(s) +7.335SpMin3_Bh(e) +7.403SpMin2_Bh(i)

Modelo	#Var	λ Wilks	CDM	Q_{prueba}	FAR_{prueba}	C_{prueba}	Función
12-Adyacencia de enlaces	7	0.51	3.8	84.4	15	0.69	1.049 +0.242SpAD_EA(bo) -7.283SpMAD_EA(bo) -0.189SpAD_EA(dm) -0.078SM15_EA(dm) +20.167SM03_EA(ri) -37.527SM05_EA(ri) +16.487SM08_EA(ri)
21-Conteo de grupos funcionales	6	0.51	3.9	85.3	13	0.71	-6.904 +0.623nCp +0.588nCs +0.584nCar +0.364nCconj +2.211"nRNR2" -0.376nHAcc
22-Fragmentos centrados en átomos	7	0.48	4.3	85.5	13	0.71	-5.9 +0.5C-024 +0.5C-025 -0.8C-040 +0.3H-046 +0.2H-047 +0.3H-052 -0.6O-058
23-Atom type E-state	5	0.47	4.4	86.3	11	0.73	-9.322 +0.363SsCH3 +0.656SssCH2 +0.623SdsCH +0.361SaaCH +0.528NaasC
24-CATS 2D	5	0.65	2.2	78.2	15	0.57	-2.26 -0.46CATS2D_02_DA +0.11CATS2D_09_AL +0.17CATS2D_03_LL +0.1CATS2D_06_LL +0.17CATS2D_09_LL
25-Pares de átomos 2D	7	0.46	4.7	87.3	10	0.75	-6.972 -2.015B02[N-O] -0.816B05[O-O] +0.965B09[C-N] +0.474F01[C-C] -0.175F01[C-O] - 0.104F06[C-O] +0.088F07[C-C]
28-Propiedades moleculares	5	0.43	5.4	89.4	8	0.79	-10.013 +0.896Hy +0.234AMR -0.056TPSA(Tot) +0.803ALOGP -0.034VvdwZAZ
29-Tipo medicamento	3	0.62	2.44	81.7	12	0.64	+1.957 +2.625Psychotic-80 -1.572Hypertens-50 - 3.249Neoplastic-80

Anexo 2: Modelos de actividad anti-leishmanial obtenidos conjugando descriptores de distintas familias

Modelo	Wilks' λ	CDM	Q_{prueba}	FAR_{prueba}	C_{prueba}	Variables
1-2Ds	0.41	5.7	89.6	9.3	0.79	-4.0 -0.80SpMax1_Bh(s) -1.1C-040 +0.52F01[C-C] +0.77ALOGP
2-2Ds	0.41	5.7	89.5	9.6	0.79	-10.9 -1.3C-040 -0.97O-058 +0.43F01[C-C] +0.068AMR
3-2Ds	0.41	5.7	89.6	10.4	0.79	-1.2 -6.2AAC -1.2C-040 +0.095AMR +0.98ALOGP
4-2Ds	0.41	5.6	89.6	9.4	0.79	-10.9 +0.41X0v -1.3C-040 -1.1O-058 +0.48F01[C-C]
5-2Ds	0.42	5.6	88.6	9.7	0.77	-9.8 +1.4Ho_H2 -1.0nHAcc -1.4C-040 -1.6Hypertens-50
6-2Ds	0.42	5.6	89.2	9.5	0.78	-10.9 +0.41X0v -1.3C-040 -1.1O-058 +0.48F01[C-C]
7-2Ds	0.42	5.6	89.2	10.8	0.79	-9.8 +1.4Ho_H2 -1.0nHAcc -1.4C-040 -1.6Hypertens-50
8-2Ds	0.42	5.6	88.3	9.8	0.77	-9.5 +1.4nRNR2 -1.3C-040 +0.46F01[C-C] +0.91ALOGP
9-2Ds	0.42	5.6	89.2	10.9	0.78	0.32 +0.30nBO -6.7AAC -1.3C-040 +1.1ALOGP
10-2Ds	0.42	5.6	88.9	9.1	0.78	-9.7 -1.2C-040 +0.15AMR -0.044TPSA(Tot) - 1.7Hypertens-50

Anexo 3: Desempeño de los modelos obtenidos por análisis discriminante lineal para predecir la actividad frente a amastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Modelo	#Var	Wilks' λ	CDM	Q_{prueba}	FAR_{prueba}	C_{prueba}	Función
1-Constitucionales	7	0.76	1.2	67	34	0.35	-4.0 +0.42nBM -0.12SCBO - 0.35RBN +20.0RBF -0.19nO +0.093N% +0.35nCsp3
2-Anillos	6	0.84	0.8	65	47	0.30	-2.3 -2.6MCD +0.75NRS - 2.4nR03 +0.74nR06 +4.1ARR - 0.006D/Dtr06
3-Topológicos	3	0.79	1.0	68	25	0.36	10.6 -28.1Xt -0.56MAXDP - 0.016TIE
4-Caminos y pasos	8	0.82	0.8	64	36	0.28	12.9 -2.5MWC10 +0.075SRW05 +2.0MPC07 -1.3piPC02 - 0.44piPC07 +0.44TPC +9.3PCR
5-Conectividad	6	0.88	0.6	67	34	0.34	6.4 -72.6X1A +42.0X2A -1.1X2v +0.81X5v +16.2X0Av +2.7RDCHI
6-Información	10	0.81	0.9	67	37	0.35	46.2 -5.7AAC -1.5VDE - 0.022Uindex -1.3Yindex -6.5C1 +12.8C3 +25.6SIC1 -14.4SIC5 - 6.5CIC0 -60.1BIC3
7- Matriz-2D	7	0.71	1.6	69	31	0.39	23.1 +4.7AVS_B(v) +1.4VE1_B(v) -71.4VE2_B(p) +16.6WiA_B(s) - 12.0SpMaxA_B(s) +5.7SpMAD_B(s) -8.1SM2_B(s)

Modelo	#Var	Wilks' λ	CDM	Q_{prueba}	FAR_{prueba}	C_{prueba}	Función
8-Autocorrelaciones 2D	7	0.63	2.3	75	23	0.51	3.8 +19.0MATS1e +5.2MATS2i - 7.4MATS1s +7.3MATS3s +4.6GATS1e -3.3GATS1p - 51.6JGI2
9-Burden eigenvalues	6	0.77	1.2	70	30	0.39	-28.8 +5.8SpMax1_Bh(v) - 3.4SpMax6_Bh(v) - 0.63SpMax2_Bh(s) +10.7SpMin3_Bh(v) +4.4SpMin5_Bh(v) - 6.3SpMin3_Bh(s)
10 - P_VSA-like descriptors	5	0.82	0.9	67	37	0.34	-0.053 -0.021P_VSA_m_2 +0.042P_VSA_e_3 - 0.007P_VSA_p_2 +0.037P_VSA_s_4 - 0.04P_VSA_s_5
11 - ETA índices	6	0.80	1.0	68	37	0.37	-5.2 -21.3Eta_alpha_A +12.7Eta_beta_A -0.11Eta_C +9.2Eta_C_A -12.5Eta_F_A +0.94Eta_FL
12-Adyacencia de enlaces	6	0.73	1.5	69	33	0.38	10.1 +5.0SpMAD_EA(bo) - 11.3SpMAD_EA(ri) - 0.99SM02_EA(dm) +1.4SM06_AEA(dm) - 1.3SM09_AEA(ri) - 2.8Eig08_EA(dm)

Modelo	#Var	Wilks'λ	CDM	Q _{prueba}	FAR _{prueba}	C _{prueba}	Función
21-Conteo de grupos funcionales (ADL21)	3	0.76	1.3	73	18	0.47	-0.59 -0.13nCs +1.6nRNR2 +1.8nArNO2
22-Fragmentos centrados en átomos	8	0.66	2.1	75	25	0.51	-0.79 -0.13C-008 +0.22C-024 +1.6C-035 -0.82-058 +1.1N-068 +0.60N-071 +0.56N-073 +0.42-107
23-Atom type E-state	6	0.72	1.5	73	27	0.46	-0.88 +0.61SaaaC +0.24SsssN +0.3SdsN -0.51NdssC +0.27NaasC -0.27NsOH
24-CATS 2D	5	0.80	1.0	65	37	0.29	-0.17 +0.094CATS2D_01_LL - 0.17CATS2D_04_DL - 0.30CATS2D_04_AA - 0.31CATS2D_05_DA +0.66CATS2D_01_AA
25-Pares de átomos 2D	2	0.89	0.1	45	65	-0.10	-0.54 -0.015F07[C-C] +0.83B08[C-C]
28-Propiedades moleculares	7	0.77	1.2	70	33	0.40	-8.4 -0.38MLOGP +0.19MLOGP2 +0.79ALOGP -0.092ALOGP2 - 0.004SAdon +7.0PDI
29-Tipo medicamento	4	0.85	0.7	68	43	0.38	65.0 +2.0cRo5 -0.64DLS_05 +1.3Psychotic-80 -1.2Neoplastic-80
ADL-A	10	0.55	3.3	80	22	0.59	5.0 -0.82MWC10 +0.72PCD - 25.0VE2_B(p) -2.3SM2_B(s) -

Modelo	#Var	Wilks' λ	CDM	Q_{prueba}	FAR_{prueba}	C_{prueba}	Función
							7.1MATS1s +4.2SpMax1_Bh(v) +1.7nRNR2 +2.1nArNO2 -0.36O- 058 -0.69BLTF96
ADL-B	8	0.55	3.3	77	25	0.54	-19.1 +12.9PCR -2.8GATS2p +4.7SpMin3_Bh(v) -5.2Eta_F_A +2.3nArNO2 -0.41O-058 +1.31N- 068 +0.065MLOGP2
ADL-C	11	0.52	3.7	80	21	0.61	-16.6 +11.9PCR +22.3X2A - 10.1SpMaxA_B(s) - 0.007P_VSA_p_2 -3.4Eta_F_A +2.3nArNO2 +1.4C-035 -0.42O- 058 +1.5N-068 +0.79N-071 +0.074MLOGP2
ADL-D	6	0.56	3.1	78	24	0.55	-71.3 +67.8X2A +13.3AVS_B(v) +4.2SpMin5_Bh(v) +1.3nArNO2 - 1.0O-058 +1.5N-068

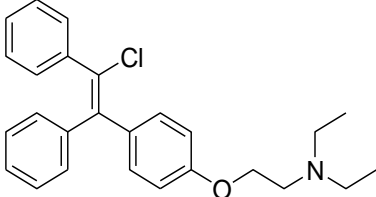
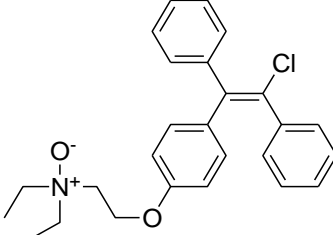
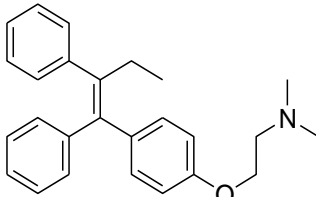
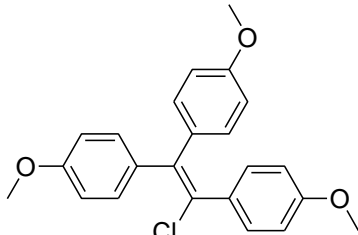
Anexo 4: Desempeño de los modelos obtenidos por análisis de k-vecinos más cercanos empleando las variables incluidas en los modelos del análisis discriminante lineal

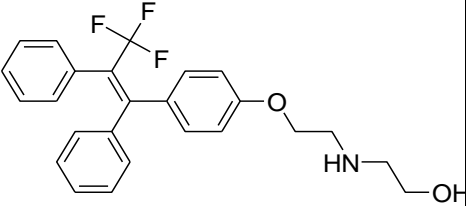
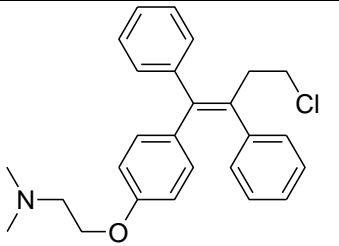
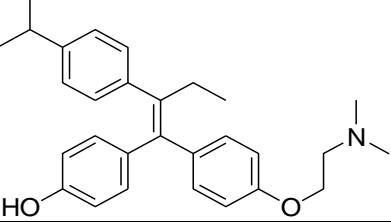
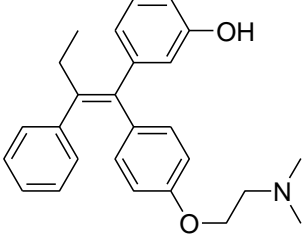
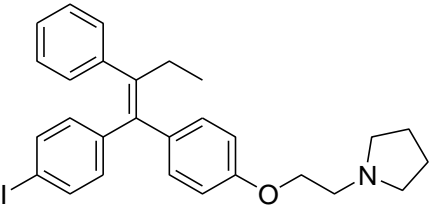
Modelo	#Var	Distancia	K	Qvc	Q_{prueba}	FAR	Sp	Se	Pr	C
2	80	Manhattan	9	80.3	79.0	24.0	76.0	82.0	77.4	0.58
4	70	Manhattan	7	81.3	76.3	26.0	74.0	78.7	75.2	0.53
6	60	Manhattan	10	81.6	79.3	21.3	78.7	80.0	78.9	0.59
7	50	Euclides	10	80.6	78.0	20.7	79.3	76.7	78.8	0.56
9	40	Euclides	7	80.4	78.0	20.7	79.3	76.7	78.8	0.56
10	40	Manhattan	10	81.6	78.0	23.3	76.7	79.3	77.3	0.56
12	30	Manhattan	6	81.6	77.3	24.7	75.3	79.3	76.3	0.55
15	10	Euclides	9	79.0	79.3	22.0	78.0	80.7	78.6	0.59
18	15	Manhattan	10	79.1	79.7	23.3	76.7	82.7	78.0	0.59
25	55	Euclides	9	81.0	77.7	20.7	79.3	76.0	78.6	0.55
28	65	Manhattan	9	81.4	79.0	24.0	76.0	82.0	77.4	0.58
30	75	Manhattan	6	82.0	77.3	26.0	74.0	80.7	75.6	0.55

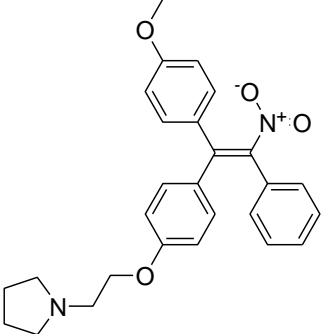
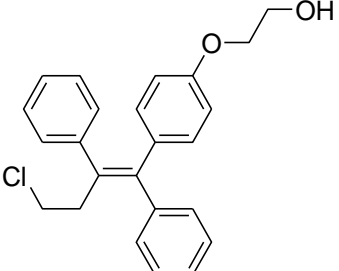
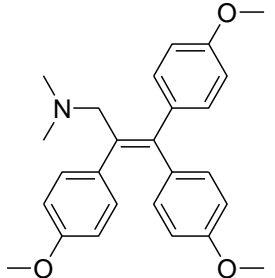
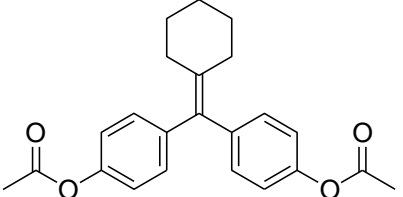
Anexo 5: Desempeño de los modelos obtenidos por análisis de k-vecinos más cercanos empleando los descriptores escogidos con el módulo de selección de variables de STATISTICA

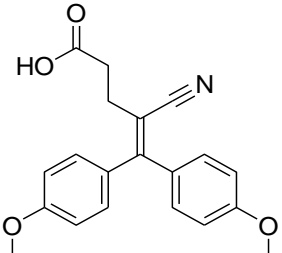
Modelo	#Var	Distancia	K	Qvc	Q _{prueba}	FAR	Sp	Se	Pr	C
A7	100	Euclides	10	77.3	79.0	30.7	69.3	88.7	74.3	0.59
A34	110	Manhattan	10	70.9	79.3	32.0	68.0	90.7	73.9	0.60
B4 (FS4)	125	Manhattan	8	75.7	80.7	20.7	79.3	82.0	79.9	0.61
B5	125	Euclides	8	76.7	80.0	20.7	79.3	80.7	79.6	0.60
B13	125	Euclides	6	78.6	82.0	23.3	76.7	87.3	78.9	0.64
B23	110	Euclides	6	78.5	82.0	23.3	76.7	87.3	78.9	0.64
B33	155	Euclides	10	77.7	79.7	28.0	72.0	87.3	75.7	0.60
C8	90	Manhattan	10	79.7	81.3	24.7	75.3	87.3	78.0	0.63
C10	80	Manhattan	9	80.0	81.7	25.3	74.7	88.7	77.8	0.64
C12 (FS12)	70	Manhattan	9	80.4	81.3	24.7	75.3	87.3	78.0	0.63
C14	60	Manhattan	10	80.4	82.0	23.3	76.7	87.3	78.9	0.64
C22	20	Manhattan	6	79.1	80.0	20.7	79.3	80.7	79.6	0.60

Anexo 6: Derivados trifeniletilénicos en uso clínico

Nombre	Acción	T _C _{clomifeno}	T _C _{tamoxifeno}	Estructura Química
Clomifeno	Estimulante gonadal (GnRH), Anti-estrógeno	1.00	0.78	
Clomifenóxido	Estimulante gonadal (GnRH)	0.94	0.73	
Tamoxifeno	Antineoplásico, Anti-estrógeno	0.78	1.00	
Clorotrianiseno	Estrogénico	0.77	0.60	

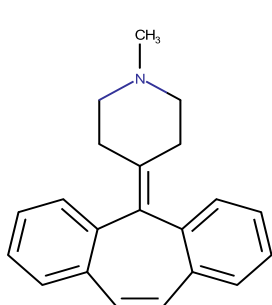
Panomifeno	Anti-estrógeno	0.73	0.72	
Toremifeno	Anti-estrógeno	0.72	0.90	
Miproxifeno	Antineoplásico Anti-estrógeno	0.72	0.91	
Droxifeno	Antineoplásico Anti-estrógeno	0.70	0.88	
Idoxifeno	Anti-estrógeno	0.68	0.80	

Nitromifeno	Anti-estrógeno	0.59	0.60	
Ospemifeno	Tratamiento de la osteoporosis Anti-estrógeno	0.59	0.74	
Amotrifeno	Vasodilatador coronario	0.57	0.62	
Ciclofenil*	Estimulante gonadal (GnRH)	0.53	0.63	

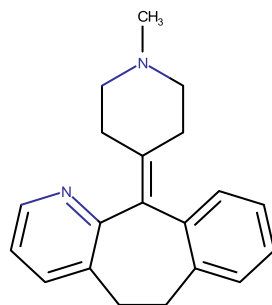
Satigrel*	Antiagregante plaquetario Antitrombótico	0.51	0.57	
-----------	--	------	------	---

$T_{\text{clomifeno}}$ y $T_{\text{tamoxifeno}}$: Coeficiente de similitud de Tanimoto con respecto al clomifeno y al tamoxifeno, respectivamente. * No son derivados trifeniletilénicos pero pudieran resultar de interés para un análisis de estructura-actividad

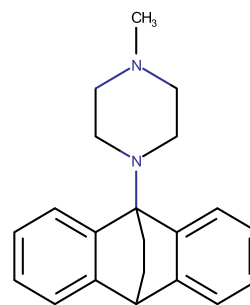
Anexo 7: Muestra de compuestos similares a la ciproheptadina en uso clínico (Tc: coeficiente de Tanimoto)



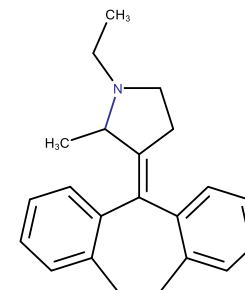
Ciproheptadina



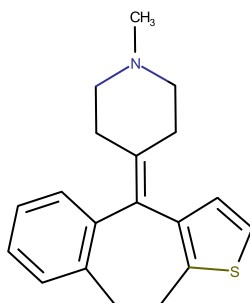
Azatadina (Tc=0.92)



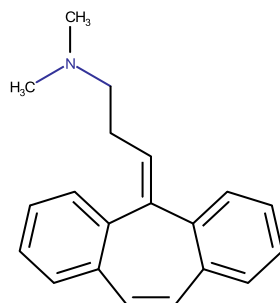
Trazitilina (Tc=0.86)



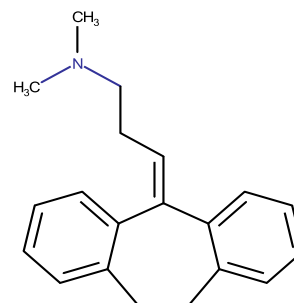
Piroheptina (Tc=0.86)



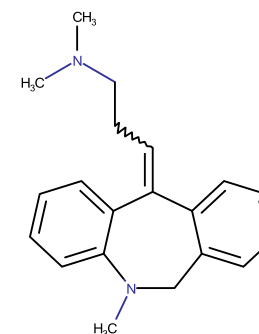
Pizotilina (Tc=0.84)



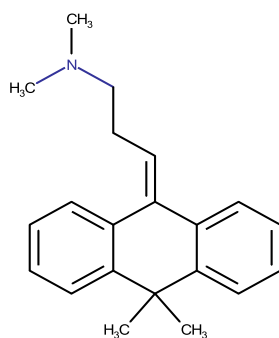
Ciclobenzaprina (Tc=0.82)



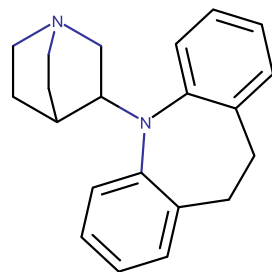
Amitriptilina (Tc=0.82)



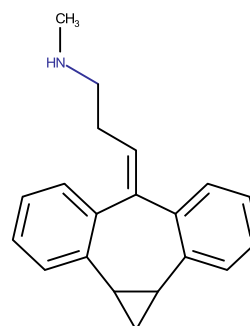
Elantrina (Tc=0.81)



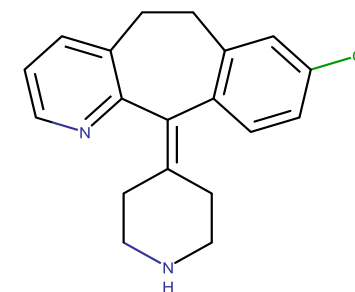
Melitracen (Tc=0.81)



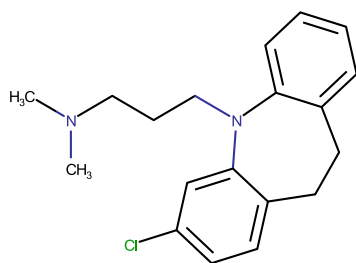
Quinupramina (Tc=0.79)



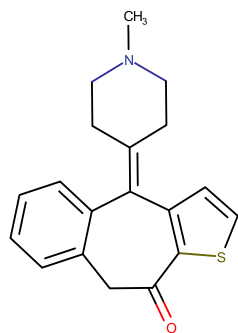
Octriptalina (Tc=0.78)



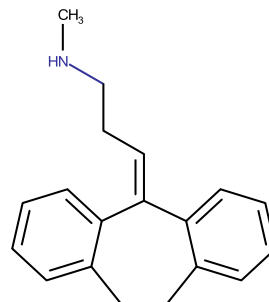
Desloratadina (Tc=0.77)



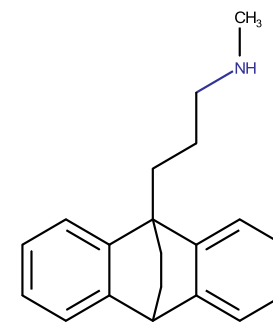
Clomipramina (Tc=0.77)



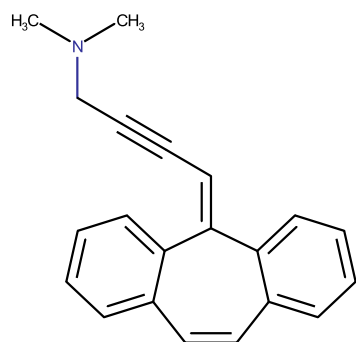
Ketotifeno
(Tc=0.77)



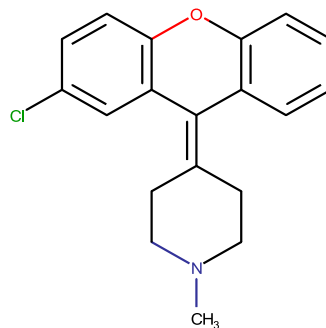
Nortriptilina (Tc=0.76)



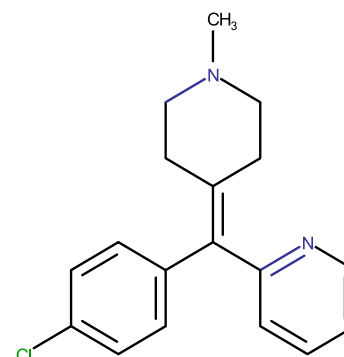
Maprotilina (Tc=0.76)



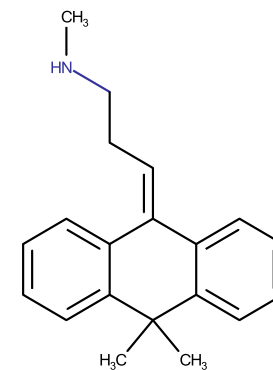
Intriptilina (Tc=0.75)



Clopazanz (Tc=0.75)



Cicliramina (Tc=0.75)



Litracen (Tc=0.74)

Relación de documentos publicados relacionados con la tesis

Publicaciones

- 1) **Sergio Sifontes-Rodríguez**, Lianet Monzote-Fidalgo, Nilo Castañedo-Cancio, Ana Margarita Montalvo-Álvarez, Yamilé López-Hernández, Niurka Mollineda Diogo, Juan Francisco Infante-Bourzac, Oliver Pérez-Martín, Alfredo Meneses-Marcel, José Antonio Escario García-Trevijano, Miguel Ángel Cabrera-Pérez. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against Leishmania in vitro and in vivo. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015;110(2):166-73.
- 2) Pablo Bilbao Ramos, **Sergio Sifontes-Rodríguez**, María Auxiliadora Dea-Ayuela, Francisco Bolás-Fernández. A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular Leishmania amastigotes. Journal of Microbiological Methods 2012;89: 8-11.

Patentes

- 3) Ana Margarita Montalvo Álvarez, Ervelio Eliseo Olazábal Manso, Juan Francisco Infante Bourzac, Lianet Monzote Fidalgo, Nilo Ramón Castañedo Cancio, **Sergio Sifontes-Rodríguez**, Yamilé López Hernández. Uso de derivados nitrovinilfuránicos. Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do Comércio Exterior, República Federativa do Brasil, 2012.
- 4) Nilo Ramón Castañedo Cancio, **Sergio Sifontes-Rodríguez**, Lianet Monzote-Fidalgo, Yamilé López Hernández, Ana Margarita Montalvo Álvarez, Juan Francisco Infante Bourzac, Ervelio Eliseo Olazábal Manso. Composiciones farmacéuticas que contienen derivados nitrovinilfuránicos para el tratamiento de la leishmaniosis y la tripanosomosis. Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, Certificado de Invención 23506, Resolución 405/2010.
- 5) Nilo Ramón Castañedo Cancio, **Sergio Sifontes-Rodríguez**, Lianet Monzote-Fidalgo, Yamilé López Hernández, Ana Margarita Montalvo Álvarez, Juan Francisco Infante Bourzac, Ervelio Eliseo Olazábal Manso. Pharmaceutical compositions containing nitrovinylfuran derivatives for the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. European Patent Office, EP1941877A1, 2008.

The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against *Leishmania* in vitro and in vivo

Sergio Sifontes-Rodríguez^{1,*}, Lianet Monzote-Fidalgo², Nilo Castañedo-Cancio¹, Ana Margarita Montalvo-Álvarez², Yamilé López-Hernández³, Niurka Mollineda Diogo¹, Juan Francisco Infante-Bourzac⁴, Oliver Pérez-Martín⁴, Alfredo Meneses-Marcel¹, José Antonio Escario García-Trevijano⁵, Miguel Ángel Cabrera-Pérez¹

¹Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central Martha Abreu de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba

²Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, La Habana, Cuba ³Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, SLP, México ⁴Instituto Finlay, La Habana, Cuba ⁵Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

Despite recent advances in the treatment of some forms of leishmaniasis, the available drugs are still far from ideal due to inefficacy, parasite resistance, toxicity and cost. The wide-spectrum antimicrobial activity of 2-nitrovinylfuran compounds has been described, as has their activity against Trichomonas vaginalis and other protozoa. Thus, the aim of this study was to test the antileishmanial activities of six 2-nitrovinylfurans in vitro and in a murine model of leishmaniasis. Minimum parasiticide concentration (MPC) and 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values for these compounds against the promastigotes of Leishmania amazonensis, Leishmania infantum and Leishmania braziliensis were determined, as were the efficacies of two selected compounds in an experimental model of cutaneous leishmaniasis (CL) caused by L. amazonensis in BALB/c mice. All of the compounds were active against the promastigotes of the three Leishmania species tested. IC₅₀ and MPC values were in the ranges of 0.8-4.7 µM and 1.7-32 µM, respectively. The compounds 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinyl)-furan (furvina) and 2-bromo-5-(2-methyl-2-nitrovinyl)-furan (UC245) also reduced lesion growth in vivo at a magnitude comparable to or higher than that achieved by amphotericin B treatment. The results demonstrate the potential of this class of compounds as antileishmanial agents and support the clinical testing of Dermofural[®] (a furvina-containing antifungal ointment) for the treatment of CL.

Key words: nitrovinylfuran - furvina - UC245 - *Leishmania* - BALB/c - promastigote

Leishmaniasis remains one of the most neglected diseases worldwide; 350 million people are considered at risk of contracting leishmaniasis and some two million new cases occur each year. In the past 10 years, major scientific breakthroughs have been made in the treatment, diagnosis and prevention of leishmaniasis and the prices of several key medicines have been reduced. However, mortality and morbidity from leishmaniasis worldwide show a worrisome increasing trend (WHO 2010). There is a pressing need to replace the few drugs that are currently available and that have substantial limitations in terms of tolerability, efficacy, cost and parasite resistance. Encouraged approaches include repurposing existing drugs, exploring drug combinations to avoid resistance and searching for new drugs (WHO 2012).

The antifungal and antibacterial activities of nitrovinyl (nitroethenyl) compounds of benzene, thiophene and furan have long been demonstrated (Bellenghi & Wittgens 1958, Alabi & Owolabi 2012, Scholz et al. 2013).

Although the presence of a nitro group in position 5 of the furan ring is not indispensable for the biological activity of 2-vinylfurans (Drobnica & Sturdik 1980), it does determine their genotoxic potential (Estrada 1998). Thus, a clear distinction between nitrofurans (nitrogen bonded to the furan ring) and nitrovinylfurans (nitrogen bonded to the side vinyl chain) should be made (Fig. 1).

Well-known nitrofurans such as nitrofurazone, nitrofurantoin and nitrofurazolidone that have been used as antibacterial drugs for years have been removed from the pharmaceutical market in many countries as a consequence of their mutagenic potential (Snyder & Green 2001). Conversely, in vivo genetic toxicity tests conducted on nitrovinylfurans have failed to demonstrate a genotoxic potential (Borrito et al. 2005).

The present paper reports testing of the antileishmanial activities of six 2-nitrovinylfurans that have previously been demonstrated to have activity against bacteria, fungi (Blondeau et al. 1999) and protozoan parasites such as *Eimeria* sp. (González-Díaz et al. 2007) and *Trichomonas vaginalis* (Meneses-Marcel et al. 2008).

MATERIALS AND METHODS

Parasites and cultures - Reference strains of *Leishmania amazonensis* (MHOM/77/LTB0016), *Leishmania infantum* (MHOM/FR/78/LEM75) and *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2 903) were used. Parasites were cultivated in Schneider's Insect Medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% heat inactivated

doi: 10.1590/0074-02760140324

* Corresponding author: sifontes@uclv.edu.cu

Received 3 September 2014

Accepted 26 January 2015

online | memorias.ioc.fiocruz.br



Note

A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania* amastigotesPablo Bilbao-Ramos^a, Sergio Sifontes-Rodríguez^b,
María Auxiliadora Dea-Ayuela^c, Francisco Bolás-Fernández^{a,*}^a Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, Spain^b Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, CP 54830, Villa Clara, Cuba^c Departamento de Química, Bioquímica y Biología Molecular, Universidad CEU Cardenal Herrera, s/n, 46113-Moncada, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2011

Received in revised form 23 January 2012

Accepted 23 January 2012

Available online 28 January 2012

Keywords:

Leishmania

Drug screening

Intracellular amastigotes

Resazurin

ABSTRACT

In this work a simple and novel method to evaluate the efficacy of compounds on intracellular *Leishmania* amastigotes by using a fluorometric assay has been developed. The new method is sensitive, easy to perform and scalable for high throughput and therefore it could be validated for screening of new anti-leishmanial agents.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania*. The parasites are heterogenic with a life cycle involving 2 alternating hosts: the vertebrate mammals where the aflagellated form named amastigote lives inside macrophages and a phlebotomine insect of the genus *Phlebotomus* or *Lutzomyia* where the monoflagellated form named promastigote lives in the digestive tract. Leishmaniasis is a cosmopolitan parasitic zoonosis and, according to the World Health Organization (WHO), about 350 million people are at risk of being infected (WHO, 2010). It exhibits a wide range of clinical manifestations that can vary from benign self-curing cutaneous ulcers to the most severe visceral leishmaniasis which is lethal if untreated. Due to the lack of an effective vaccine, the control of the disease relies on chemotherapy, which is mainly based on pentavalent antimonial derivatives, the polyene antibiotic amphotericin B, the phosphocholine derivative miltefosine and the aminoglycoside antibiotic paramomycin (Seifert et al., 2010). However, the effectiveness of these compounds is limited and compromised by the serious side effects of some of them, the increased development of resistance in endemic areas as well as the high cost of low toxic formulations such as the liposomal amphotericin B (Ambisome®). Consequently, efficient cure of severe leishmaniasis (e.g. visceral or mucocutaneous forms) is far from being successfully achieved and therefore the search for safer new drugs or new formulation of the classical ones should be of first

priority. High throughput screening for the selection of active compounds against *Leishmania* spp. must be easy, reproducible and quick to perform. In addition, they must faithfully reflect the natural conditions of the parasite inside the host (Serenio et al., 2007). The methods that are currently being applied for the screening of new active compounds using either promastigotes or axenic amastigotes are based on microscopic counting, enzyme-colorimetric techniques or flow cytometry. Using intracellular amastigotes, a more reliable stage closer to the natural physiological conditions, microscopic counting is often replaced by flow cytometry with fluorescent markers, monoclonal antibodies or even with reporter genes in transfected cells (Serenio et al., 2007). However, all these techniques have several disadvantages as they could be difficult to perform, expensive and non scalable for automation. Besides, they do not provide information on parasite viability.

In this paper a new method, which could be easily adapted to semi-automated high-throughput screening, is developed by using intramacrophagic amastigotes. It is based on the combination of host cell lysis (Mauel et al., 1978; Kiderlen and Kaye, 1990; Chakour et al., 2009), followed by viable amastigotes transformation into promastigotes and proliferation, and the use of a fluorescent substrate to measure parasite concentration and viability.

To set the new assay up, two drugs among those currently marketed for the chemotherapy of leishmaniasis were selected as reference compounds: amphotericin B deoxycholate (fungizone®) and miltefosine. The former was provided by Bristol-Myers Squibb, SL for research purposes and the latter was purchased from Sigma® under the code M5571.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 1818; fax: +34 91 394 1815.
E-mail address: francisb@farm.ucm.es (F. Bolás-Fernández).



REPÚBLICA DE CUBA

La Directora General de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial
en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido
en las disposiciones legales vigentes,
concede el presente:



**CERTIFICADO DE
AUTOR DE INVENCION**

(72) Autor (es) o coautor (es):

NILO RAMÓN CASTAÑEDO CANCIO
SERGIO SIFONTES RODRÍGUEZ
LIANET MONZOTE FIDALGO
YAMILÉ LÓPEZ HERNÁNDEZ
ANA MARGARITA MONTALVO ÁLVAREZ
JUAN FRANCISCO INFANTE BOURZAC
ERVELIO ELISEO OLAZÁBAL MANSO

(71) Solicitante (es):


CENTRO BIOACTIVOS QUÍMICOS, UNIVERSIDAD CENTRAL DE LAS
VILLAS, con domicilio legal en carretera a Camajuaní, km 5 1/2, 54 830, Santa Clara,
Villa Clara, República de Cuba.

(11) Certificado Nro. : 23506

Concedido por Resolución No.405/2010

(54) Título: **COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE CONTIENEN DERIVADOS
NITROVINILFURÁNICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA
LEISHMANIOSIS Y LA TRIPANOSOMOSIS**

Dado en La Habana, a 26 de febrero de 2010.


M.Sc. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora General
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial



EP 1 941 877 A1

EUROPEAN PATENT APPLICATION
published in accordance with Art. 153(4) EPC

(43) Date of publication:
09.07.2008 Bulletin 2008/28

(51) Int. Cl.:
A61K 31/34 (2006.01) **A61K 33/00** (2006.01)

(21) Application number: **06791280.8**

(86) International application number:
PCT/CU2006/000009

(22) Date of filing: **18.09.2006**

(87) International publication number:
WO 2007/033616 (29.03.2007 Gazette 2007/13)

(84) Designated Contracting States:
**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LI
LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI SK TR**
Designated Extension States:
AL BA HR MK RS

(72) Inventors:

- **CASTAÑEDO CANCIO, Nilo, Ramón**
Villa Clara 50100 (CU)
- **SIFONTES RODRIGUEZ, Sergio**
Ciudad De La Habana 11500 (CU)
- **MONZOTE FIDALGO, Lianet**
Ciudad De La Habana 13900 (CU)
- **LOPEZ HERNANDEZ, Yamilé**
Ciudad De La Habana 11500 (CU)
- **MONTALVO ÁLVAREZ, Ana, Margarita**
Ciudad De La Habana 10500 (CU)
- **INFANTE BOURZAC, Juan, Francisco**
Ciudad De La Habana 10300 (CU)
- **OLAZABAL MANSO, Ervelio, Eliseo**
Villa Clara 50300 (CU)

(30) Priority: **26.09.2005 CU 20050175**

(71) Applicant: **CENTRO DE BIOACTIVOS QUIMICOS**
Santa Clara, Villa Clara 54830 (CU)

(74) Representative: **Hatzmann, Martin et al**
VEREENIGDE Johan de Wittlaan 7
2517 JR Den Haag
2517 JR Den Haag (NL)

(54) **PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING NITROVINYL FURAN DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF LEISHMANIASIS AND TRYPANOSOMIASIS**

(57) The present invention describes the action of a new family of drugs against a number of *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*, for the treatment of cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis as well as tripanosomosis. *In vitro* assays and studies conducted in animal models and in human patients demonstrated that the compounds had a higher activity compared to drugs in clinical use against *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. donovani infantum*, *L. braziliensis braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*. The pharmaceutical activity of compositions based on such family of compounds was evidenced and supports its human and veterinary application for the treatment of the above-mentioned diseases by using different administration routes.



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) **PI 0616340-8 A2**

(22) Data de Depósito: 18/09/2006
(43) Data da Publicação: 26/12/2012
(RPI 2190)



(51) *Int.Cl.*:
A61K 31/34
A61K 33/00

(54) Título: USO DE DERIVADOS
NITROVINILFURÂNICOS

(30) Prioridade Unionista: 26/09/2005 CU 2005-0175

(73) Titular(es): CENTRO DE BIOACTIVOS QUIMICOS

(72) Inventor(es): Ana Margarita Montalvo Alvarez, Ervelio Eliseo Olazábal Manso, Juan Francisco Infante Bourzac, Lianet Monzote Fidalgo, Nilo Ramón Castañedo Cancio, Sergio Sifontes Rodriguez, Yamilé Lopez Hernandez

(74) Procurador(es): MOMSEN LEONARDOS & CIA

(86) Pedido Internacional: PCT CU2006000009 de
18/09/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/033616de
29/03/2007

(57) Resumo: USO DE DERIVADOS NITROVINILFURÂNICOS. A invenção diz respeito à ação dos representantes de uma nova família de produtos em relação às diferentes cepas de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*, para o tratamento da leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral, bem como da tripanossomíase. Os produtos acima mencionados demonstram maior eficácia do que os medicamentos já no mercado nos estudos *in vitro* em animais de laboratório e em seres humanos em relação à *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. donovani infantum*, *L. braziliensis braziliensis* e *Trypanosoma cruzi*. O efeito farmacêutico das formulações da referida família é provado para uso em seres humanos e veterinários no tratamento das doenças acima mencionadas usando-se diferentes vias de administração.